



Caractérisation par diffusion de second harmonique de nanocristaux pour l'imagerie biomédicale

Cécile Joulaud

► To cite this version:

Cécile Joulaud. Caractérisation par diffusion de second harmonique de nanocristaux pour l'imagerie biomédicale. Autre. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENA008 . tel-00856045

HAL Id: tel-00856045

<https://theses.hal.science/tel-00856045>

Submitted on 30 Aug 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Sciences pour l'ingénieur**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Cécile JOULAUD

Thèse dirigée par **Ronan Le Dantec, Jean-Pierre Wolf**
et codirigée par **Yannick Mugnier**

préparée au sein du **Laboratoire SYMME : Systèmes et Matériaux pour la MEcatronique**
et de l'**École Doctorale SISEO**

Caractérisation par diffusion de second harmonique de nanocristaux pour l'imagerie biomédicale

Thèse soutenue publiquement le **29 mai 2013**,
devant le jury composé de :

Patrice Baldeck

Directeur de recherche, CNRS/Université Joseph Fourier Grenoble, Président

Sophie Brasselet

Directrice de recherche, CNRS/Université Aix-Marseille, Rapporteur

Ronan Le Dantec

Professeur, Université de Savoie, Directeur de thèse

Yannick Mugnier

Maître de conférences, Université de Savoie, Co-Directeur de thèse

Vincent Rodriguez

Professeur, Université de Bordeaux, Rapporteur

Jean-Pierre Wolf

Professeur, Université de Genève, Suisse, Directeur de thèse



Remerciements

A l'heure de clôturer cette thèse, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation et m'ont apporté conseils, soutien et enthousiasme.

Tout d'abord, je souhaite adresser mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Ronan Le Dantec et mon co-directeur Yannick Mugnier au laboratoire SYMME pour leur accueil et leur intégration au sein de l'équipe des (nano-)matériaux. Je tiens à leur exprimer ma gratitude pour leur soutien pendant ces trois années et la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de ce travail, particulièrement pendant les périodes les plus difficiles. Je les remercie autant pour leur apport scientifique et leurs conseils avisés que pour leurs qualités humaines, leur disponibilité et leurs encouragements. Merci pour ces discussions stimulantes lors de réunions relativement régulières malgré des emplois du temps souvent incompatibles. Merci également pour l'aide précieuse notamment en instrumentation (et autres débogages sur le programme labVIEW) et pour avoir fait régulièrement le lien entre mon travail et les avancées réalisées parallèlement en salle de chimie. Je n'oublie pas non plus les discussions lors de trajets réguliers pour les réunions de projet à Genève, ou de manière plus exceptionnelle devant une Guinness à Dublin.

Une petite partie de ce travail s'est déroulée au GAP-biophotonics de l'université de Genève où j'ai été accueillie par Jean-Pierre Wolf que je remercie pour cette opportunité. Cette collaboration m'a apporté une ouverture précieuse grâce à l'aide de Luigi Bonacina, à ses réponses dans le domaine de l'optique toujours envoyées avec réactivité, à ses conseils avertis lors de la rédaction d'articles et à sa remarquable gestion du projet de recherche au sein duquel s'est déroulée cette thèse. Que ce soit à Genève ou à Carouge, j'ai toujours apprécié l'accueil chaleureux des membres de ce laboratoire (et le traditionnel café proposé avant toute autre chose).

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Sophie Brasselet et Vincent Rodriguez en tant que rapporteurs de ce travail pour leurs remarques constructives et pour avoir partagé leur expertise sur ce sujet ainsi que Patrice Baldeck pour avoir accepté d'être président de mon jury et pour la discussion très intéressante qu'il a engagée.

Il est important pour moi de replacer ce travail dans le contexte des projets Naomi et Namdiatream qui ont permis de donner du sens à mon activité mais également de m'ouvrir sur de nouveaux horizons dans des domaines tels que la biologie, la microscopie ou la synthèse de cristaux. Je tiens à ce titre à remercier tous les membres de ces projets pour leurs échanges enrichissants. En particulier, les conseils fournis par Davide Staedler (EPFL) et Daniel Ciepelski (Nikon) m'ont été très utiles lors de la rédaction de ce manuscrit. J'ai également eu l'opportunité de travailler avec Thibaud Magouroux, Jérôme Extermann et Denis Kiselev du GAP-biophotonics sur des plateformes optiques autrement plus impressionnantes que la

mienne et j'ai eu le plaisir de travailler conjointement avec Sebastian Schwung (FEE) lors de son séjour à Annecy.

Certaines personnes ont apporté une contribution toute particulière à la réalisation de ce travail. Je pense à Djanta Gnon qui m'a initié à l'emploi de suspensions de nanoparticules tout en supportant nos froids polaires, avec qui j'ai passé de nombreux moments sur des mesures à 135° (sans compter les heures, même le jour de son anniversaire) et qui a pris le temps de m'expliquer toute la théorie attenante. Une partie de ce travail n'aurait pas vu le jour sans Moustafa El Kass avec qui la réalisation d'expériences s'est toujours déroulée dans la bonne humeur et qui a fait preuve de disponibilité pour répondre à mes questions, même longtemps après son départ du laboratoire. Je me rappelle également les conversations très variées que nous avons pu avoir et bien évidemment les petits gâteaux libanais. Je remercie également Marc Dubled pour son aide précieuse concernant la préparation de suspensions, les nombreuses heures passées devant le MEB pour traquer des nanocristaux variés, des aiguilles d'iodate de fer entre autres, les diverses discussions "nanoparticulaires" et un bonus pour avoir supporté en tant que voisin de bureau mes divagations et mes goûts musicaux plus que douteux dans les moments de stress (je n'oublierai pas les malabars dûment gagnés pendant ma rédaction).

Je suis particulièrement reconnaissante envers Jean-Christophe Marty pour sa disponibilité sans faille toujours dans la bonne humeur ainsi que pour son assistance très appréciée sur la technique de diffraction de rayons X ou lorsqu'il s'agit de trouver quelque matériel en salle de chimie. Je tiens aussi à remercier Blaise Girard pour son aide précieuse concernant l'amélioration du banc expérimental, son enthousiasme et ses nombreuses idées toujours fructueuses. Merci également à Jérôme Anglade pour la mise en place de matériel informatique son assistance précieuse lors de problèmes techniques.

Deux personnes importantes au laboratoire ont également favorisé le très bon déroulement de cette thèse, Christelle Davanzo et Nassika Laouici, toujours prêtes à rendre service avec le sourire depuis les tout premiers contacts à mon arrivée en 2010 et jusqu'à la préparation *in extremis* de mon pot de thèse. Merci également à Agnès Tremolada pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

Je souhaite remercier toute l'équipe des (nano-)matériaux fonctionnels (maintes fois rebaptisée) pour m'avoir intégrée et pour les quelques séminaires très intéressants auxquels j'ai pu assister. Je pense en particulier à Christine Galez, sa gentillesse et son accessibilité, ses nombreux conseils à tous points de vue et son écoute précieuse. Je remercie Christiane Durand pour son rôle concernant l'hygiène et la sécurité des salles de manipulation. Je suis également reconnaissante envers Philippe Galez pour m'avoir formée à l'utilisation de la diffraction de rayons X. Je n'oublie pas non plus toutes les personnes qui se sont investies dans le déménagement du laboratoire et des salles de manip alors que j'étais particulièrement occupée par ailleurs (d'autant plus qu'ils ont dû faire les cartons deux fois ...).

J'ai également eu l'opportunité durant cette thèse de découvrir et apprécier l'enseignement au sein du département Mesures Physiques à l'IUT d'Annecy, et ce notamment grâce à l'accueil chaleureux de toute l'équipe et aux conseils reçus de la part de différents enseignants. J'ai une pensée particulière pour Sandrine Beauquis qui m'a encadrée en tant que monitrice et a toujours été disponible pour répondre à mes questions. Je remercie également Marc Lomello pour les quelques discussions pédagogiques que nous avons pu avoir et pour ses conseils avisés, Yves Zolnierowski pour sa disponibilité et son aide dans le domaine de la thermodynamique et Guillaume Poulet pour ses réponses toujours réactives.

Ces 3 années de thèse ont également été inspirées par un petit air celtique grâce à mes voisins de bureau irlandais. Merci à Gareth pour nos premières discussions en salle de chimie en début de thèse, les diverses conversations scientifiques toujours enrichissantes et une visite guidée de Dublin sous le soleil. Merci également à Derek pour son aide lors de la réalisation d'expériences et à James pour sa sympathie et la patience dont il a fait preuve pendant la période de rédaction.

Je n'oublie pas non plus mes collègues doctorants en matériaux expatriés, Rachid et Mehdi et les conversations échangées lors de leurs visites occasionnelles à Annecy.

Un grand merci aux collègues du laboratoire, aux inconditionnels de la pause café de 10h, à ceux avec qui j'ai partagé de nombreux repas de midi en salle des personnels et aux personnes parfois moins présentes mais qui m'ont apporté des conseils divers et variés ou avec lesquels j'ai tout simplement pu avoir des conversations extra-professionnelles qui m'ont changé les idées de temps à autre. Je pense aussi à tous les collègues doctorants (ou déjà docteurs) sans lesquels ces trois ans auraient été bien différents, il n'y aurait pas eu les mêmes pauses café devant la cafet de Polytech, ni de quizz à l'amnésie, de concerts au bistro des Tilleuls ou autres soirées crêpes. Merci à Emmanuelle, Ronan, Mathieu, Gaëtan, Rémi, Hugues, Boukar, Nathalie, Tobias ... et mon premier voisin de bureau Ciprian pour m'avoir dit qu'"à la fin, ça s'est bien passé".

Merci également à mes colocos, en particulier Guillaume pour les bons moments et les soirées avec les physiciens du Lapp.

J'ai une pensée spéciale pour les amis qui m'ont soutenue pendant ces trois années et qui savent à quel point cela a été important pour moi. Lili (qui m'a rappelé que j'envisageais déjà de faire une thèse dès le premier jour de mes études), Perrine, Mathilde M., Mathilde B., Camille, Marie F., Marie G., Lucie, JM, Simon, Émile, Martin et Elisabeth.

Une dernière pensée à ma famille qui a été avec moi, cousins et oncles et tantes, en particulier Paul-Xavier et Maryse pour leur accueil bienveillant dans les périodes de doute.

Et enfin, merci à mes parents pour leur très précieux soutien et à mes frères François et Olivier qui ont toujours cru en moi et n'ont jamais cessé de m'encourager.

Table des matières

Introduction	1
1 Génération de Second Harmonique de nanoparticules et applications en imagerie bio-médicale	5
I Optique Non Linéaire et Génération de Second Harmonique	5
I.1 Introduction à l'optique non linéaire	6
I.2 Propriétés ONL de second ordre	8
I.2.a Susceptibilité non linéaire d'ordre 2	8
I.2.b Symétrie cristalline	10
I.3 Moment dipolaire induit et polarisabilité moléculaire	11
II Applications en biologie : marquage et imagerie	12
II.1 Microscopie multiphotonique	12
II.1.a Principe et enjeux en imagerie biomédicale	12
II.1.b Exemples d'applications	15
II.1.c Marqueurs optiques luminescents	15
II.2 Marqueurs GSH : état de l'art	17
II.2.a Intérêts des marqueurs GSH pour l'imagerie biomédicale	19
II.2.b Microscopie de GSH : technologie	22
II.2.c Marqueurs : synthèse et fonctionnalisation	23
II.2.d Applications des marqueurs GSH pour l'imagerie biologique	27
II.3 Alternatives	33
II.3.a Nanodiamants fluorescents	34
II.3.b Upconversion	34
III Conclusion	35
2 Diffusion Hyper-Rayleigh ou de second harmonique : principe et configuration expérimentale	37
Introduction	37
I Principe de la technique de diffusion Hyper-Rayleigh	38
I.1 Généralités	38
I.2 Détermination théorique du signal de diffusion	39
I.3 Mesures résolues en polarisation	43
I.4 Méthodes de caractérisation des coefficients ONL	43
I.4.a Détermination des coefficients moyens $\langle \beta \rangle$	43
I.4.b Détermination des coefficients indépendants β_{ij}	45
I.5 Conclusion	46

II	Mesures HRS sur des nanocristaux	46
II.1	Application de la théorie HRS aux nanocristaux	46
II.1.a	Caractérisation HRS de nanocristaux dans la littérature	46
II.1.b	Notion d'hyperpolarisabilité effective d'un nanocristal	47
II.2	Coefficients moyens $\langle \beta \rangle$ et $\langle d \rangle$: méthode par référence externe appliquée aux particules	48
II.3	Coefficients indépendants d_{ij}	50
II.3.a	Méthode du rapport de dépolarisation	50
III	Système expérimental	51
III.1	Description du banc d'optique	52
III.2	Système de détection et d'acquisition	52
III.3	Limite expérimentale de détection	54
III.3.a	Optique et détection	54
III.3.b	Signal HRS de référence	54
III.3.c	Zone sondée par le laser	55
III.3.d	Estimation de la limite de détection pour des suspensions	56
IV	Préparation et caractérisation de suspensions de nanocristaux	57
IV.1	Préparation de suspensions colloïdales	57
IV.2	Caractérisations des suspensions	58
IV.2.a	Taille des nanoparticules	58
IV.2.b	Diffraction des Rayons X (DRX)	59
IV.2.c	Forme et aspect des nanoparticules	59
IV.2.d	Concentration des suspensions	59
IV.2.e	Stabilité des suspensions	60
IV.3	Préparation d'une solution de para-nitroaniline	60
V	Conclusion	61
3	Efficacités optiques moyennes des nanocristaux	63
I	Présentation des différentes particules	63
I.1	BaTiO ₃	63
I.2	KNbO ₃	64
I.3	KTP	65
I.4	LiNbO ₃	65
I.5	ZnO	67
II	Exemple détaillé des nanocristaux de KNbO ₃	67
II.1	Préparation des échantillons et mesure de taille	68
II.2	Détermination de la concentration	68
II.3	Mesure du signal HRS	69
II.4	Calcul des coefficients moyens	69
III	Validité du protocole	70
III.1	Signal HRS	70
III.1.a	Optique	70
III.1.b	Luminescence et signaux parasites	72
III.1.c	Stabilité des échantillons de référence	72
III.1.d	Stabilité des suspensions	73
III.1.e	Agrégation	74
III.1.f	Régime de Rayleigh	74
III.1.g	Absorption et diffusion	76
III.2	Mesures de taille des nanoparticules	77
III.2.a	Effet de la polydispersité	77
III.2.b	Agrégats	80
III.2.c	Forme des particules	81
III.3	Mesure de concentration des particules	81
III.3.a	Concentration massique	81

III.3.b	Concentration N	82
III.4	Influence de la distribution en taille sur l'intensité HRS	83
IV	Résultats : coefficients moyens $\langle d \rangle$ et $\langle \beta \rangle$	85
V	Conclusion	87
4	Détermination des coefficients indépendants d_{ij}	89
I	Mesures HRS résolues en polarisation	89
I.1	Validité du protocole	89
I.1.a	Reproductibilité expérimentale	90
I.1.b	Agrégation	90
I.1.c	Taille et polydispersité	91
I.1.d	Effets de la concentration	92
I.2	Rapport de dépolarisation des différentes nanoparticules	93
I.2.a	Tenseur "simple"	93
I.2.b	Tenseur "complexe"	94
II	Effets de forme des particules : croissance d'aiguilles d'iodate de fer	95
II.1	Croissance d'aiguilles d'iodate de fer	96
II.1.a	Synthèse de nanoparticules en microémulsion	96
II.1.b	Suivi <i>in situ</i> de la cinétique de croissance en HRS	96
II.1.c	Mécanisme de croissance des aiguilles d'iodate de fer	96
II.2	Évolution du rapport de dépolarisation pendant la croissance d'aiguilles	98
II.2.a	Méthodes	98
II.2.b	Mesures optiques	98
II.3	Modélisation de la GSH dans une particule longiligne	99
II.3.a	Hypothèses	99
II.3.b	Formalisme	100
II.3.c	Application aux aiguilles d'iodate de fer	101
III	Conclusion	102
5	Caractérisation ONL du BiFeO_3	105
I	Introduction	105
I.1	Particularités et intérêts du BiFeO_3	105
I.2	Propriétés physiques générales	105
I.3	Propriétés optiques non linéaires	107
II	Caractérisations optiques non linéaires	107
II.1	Mesures HRS sur différents échantillons	108
II.1.a	Premières mesures	108
II.1.b	Deuxième série de mesures : estimations plus précises	109
II.1.c	Conclusion et particularités des caractérisations HRS du BFO	110
II.2	Coefficients moyens du BFO	111
III	Conclusion	113
	Conclusion et perspectives	115
	Bibliographie	119
	Table des Figures	131
	Liste des Tableaux	135
A	Volume de solution excité par le laser au point focal	137
B	Détermination du coefficient moyen de référence du pNA	139
C	Mesure de $\langle d \rangle$ dans différentes configurations expérimentales	141

D	Approximation statistique des distributions en taille	143
E	Mesures optiques et DLS	147
F	Détermination des coefficients moyens $\langle d \rangle$ à partir des valeurs de la littérature	151

Introduction

Depuis plusieurs années, les avancées médicales et technologiques réalisées dans le cadre de la recherche contre le cancer ont nettement augmenté les chances de survie et de guérison face à cette maladie. Cependant, elle reste l'une des premières causes de mortalité en Europe avec environ 1,7 millions de décès chaque année ¹ et des progrès restent à accomplir en termes de prévention, de diagnostic précoce et de prise en charge. Dans ce contexte, les avancées récentes en synthèse, stabilisation et fonctionnalisation de nanomatériaux ont permis de développer des marqueurs de taille nanométrique compatibles avec les milieux biologiques, permettant ainsi d'envisager des avancées majeures pour le diagnostic précoce et le suivi du traitement de telles maladies.

Par ailleurs, les récents progrès dans le domaine de l'imagerie optique sont importants et ouvrent de nombreuses possibilités en termes d'applications pour la biologie et la médecine. En effet, la large diffusion de techniques telles que la microscopie confocale et la microscopie multiphotonique couplée au développement de marqueurs fluorescents est à l'origine de progrès significatifs en imagerie biomédicale. Cependant, l'utilisation de ces techniques basées principalement sur la fluorescence présente certaines limitations. L'autofluorescence des tissus a tendance à réduire le contraste optique, le temps d'observation est souvent restreint à des durées de l'ordre de quelques dizaines de minutes en raison du photoblanchiment des marqueurs organiques et des inconvénients tels que le clignotement de la fluorescence peuvent apparaître avec l'utilisation de nanocristaux semi-conducteurs, appelés *Quantum Dots* (ou boîtes quantiques). Ces derniers présentent également une toxicité élevée qui peut les exclure de certaines applications biologiques, en particulier *in vivo*. Enfin, pour les marqueurs organiques, la toxicité générée par des effets de photodégradation chimique peut être également problématique.

Face à ces limitations, une nouvelle génération de sondes optiques à propriétés optiques non linéaires est en cours de développement. Il s'agit de nanocristaux de structure cristalline non-centrosymétrique qui ont la particularité de générer un rayonnement à la fréquence double lorsqu'ils sont soumis à un flux incident intense. En microscopie multiphotonique, l'exploitation de ce processus, appelé génération de second harmonique (GSH), offre de nouvelles possibilités en termes de suivi sur de longues durées et de profondeur de pénétration dans les tissus biologiques ²³⁴. En effet, la génération de second harmonique est un phénomène non résonant, limitant ainsi la photodégradation des marqueurs et permettant leur suivi sur de longues durées. De plus, ce processus optique est relativement indépendant de la longueur d'onde d'excitation, ce qui permet de travailler dans le proche infrarouge. Dans cette gamme spectrale les tissus biologiques absorbent peu. On augmente ainsi la profondeur d'imagerie tout en diminuant l'énergie lumineuse déposée dans l'échantillon.

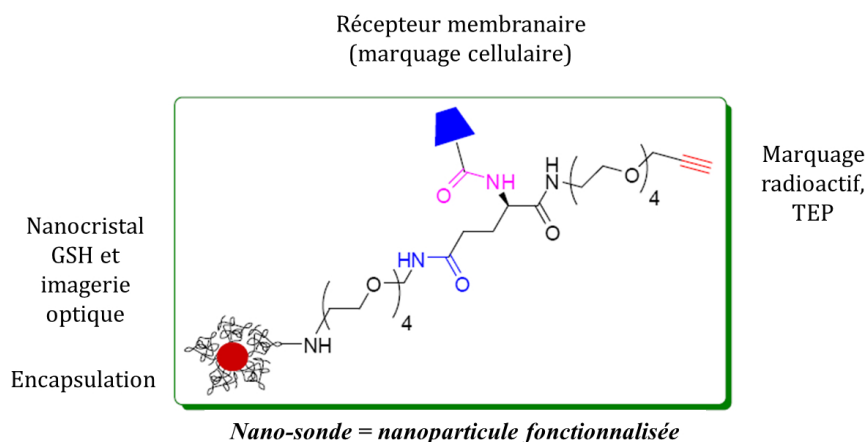
1. Portail de la commission européenne pour la santé publique, http://ec.europa.eu/health-eu/index_en.htm

2. B. E. Cohen, Biological imaging : Beyond fluorescence, *Nature*. 467, 407-408 (2010)

3. W. Dempsey, S. Fraser, P. Pantazis, SHG nanoprobe : Advancing harmonic imaging in biology *BioEssays*, 34, 351-360 (2012)

4. L. Bonacina, Nonlinear Nanomedicine : Harmonic Nanoparticles toward Targeted Diagnosis and Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 10 (3), 783-792, 2012

Au laboratoire SYMME, Les projets de recherche collaboratifs Naomi ⁵ (Nano-sOndes Multifonctionnelles pour l'Imagerie) et Namdiatream ⁶ (NAnotechnological toolkits for Multi-modal disease DIAGnostics and TREAtment Monitoring) ont ainsi pour objectif le développement de nano-sondes performantes pour l'imagerie biomédicale et le diagnostic précoce de cellules tumorales.



L'utilisation de tels marqueurs pour ces applications nécessite de regrouper des compétences multidisciplinaires allant de la synthèse des nanocristaux à leur manipulation en milieu biologique, en passant par la maîtrise des techniques de microscopie. Ces différents thèmes de recherche sont étudiés par différents partenaires impliqués selon leur domaine de compétences. La société de cristallogénèse FEE ⁷ travaille sur la synthèse des nanocristaux ainsi que le laboratoire SYMME ⁸, qui a aussi pour rôle de quantifier les propriétés de GSH des particules obtenues et de les stabiliser en milieu aqueux par une modification de leur chimie de surface. La synthèse et l'encapsulation des nanocristaux est également développée au laboratoire LAGEP ⁹. La fonctionnalisation des particules pour un marquage spécifique est développée par le laboratoire de chimie LSPN ¹⁰ en coopération avec une équipe de recherche en chimie biomédicale du CHUV ¹¹. Cette même équipe est également responsable de la manipulation des milieux biologiques, des études de toxicité et des observations *in vitro* de marquage sur différentes lignées cellulaires. L'imagerie biphotonique est réalisée au sein du laboratoire GAP-biophotonics ¹² sur une plateforme développée par Nikon. L'entreprise AAA ¹³, qui développe des marqueurs radioactifs pour la tomographie à émission de positons, est également impliquée dans ce projet de recherche dans l'optique de développer des sondes multifonctionnelles. Par ailleurs, une équipe de biologie du laboratoire CARRTEL ¹⁴ s'intéresse au marquage spécifique de bactéries en milieux biologiques lacustres pour les aspects biodiversité et pollution. L'entreprise Epithelix ¹⁵ est concernée quant à elle par des applications de vectorisation de médicaments pour les troubles respiratoires et par un marquage permettant d'observer l'efficacité des traitements utilisés. Une dernière équipe partenaire, issue du CHU de Genève ¹⁶, a pour thématique principale de recherche la différenciation de cellules souches en cellules cardiaques et ce pour des applications thérapeutiques.

Mon travail de thèse s'inscrit dans cette démarche générale et porte plus particulièrement sur la caractérisation des propriétés de GSH des nanocristaux. Ces propriétés optiques, communément caractérisées

5. NAOMI : projet interreg France Suisse

6. Namdiatream : projet Européen FP7 (<http://www.namdiatream.eu/>)

7. FEE GmbH (Forschungsinstitut für mineralische und metallische Werkstoffe - Edelsteine/Edelmetalle), Idar-Oberstein, Allemagne

8. SYstèmes et Matériaux pour la Mécatronique, Université de Savoie, Annecy-le-Vieux, France

9. Laboratoire d'Automatique et de Génies de Procédés, Lyon, France

10. Laboratory of Synthesis and Natural Products, Institut des Sciences et Ingénierie Chimiques, EPFL, Lausanne, Suisse

11. Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Institut universitaire de pathologie de Lausanne, Suisse

12. Group of Applied Physics, Université de Genève, Suisse

13. Advanced Accelerator Applications, Saint-Genis Pouilly, France

14. Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques des Ecosystèmes Limniques, Université de Savoie, Le Bourget-du-Lac, France

15. Entreprise de biotechnologie spécialisée en ingénierie tissulaire, Genève, Suisse

16. Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Genève

sur des cristaux massifs, des poudres micrométriques et des couches minces, sont peu étudiées à l'échelle des cristaux nanométriques. En raison de leur taille, il est en effet impossible d'utiliser les moyens usuels de caractérisation. La microscopie de GSH permet dans une certaine mesure d'accéder à des informations pertinentes sur les propriétés optiques non linéaires des nanoparticules mais son utilisation est limitée d'un point de vue quantitatif. Dans ce travail, nous mettons en application une technique basée sur des mesures d'ensemble pour déterminer les efficacités de GSH de nanocristaux. A l'origine, la technique de diffusion Hyper-Rayleigh a été développée afin de caractériser les propriétés optiques non linéaires de molécules. Par la suite, son application a été étendue à des objets de plus grande taille tels que des assemblages moléculaires ou des nanoparticules centrosymétriques et métalliques. La caractérisation de nanocristaux non-centrosymétriques est relativement nouvelle et seules quelques études font actuellement part de l'utilisation, présentée dans ce travail, de la technique de diffusion Hyper-Rayleigh pour cet objectif.

Ce mémoire est divisé en cinq chapitres. Dans le chapitre 1, nous introduisons les notions d'optique non linéaire nécessaires à la compréhension de ce travail. Elles permettront de mieux appréhender les intérêts des nanocristaux GSH qui sont ensuite détaillés pour l'imagerie. Le principe et les avantages de la microscopie multiphotonique sont également présentés puis nous donnons un état de l'art sur l'utilisation des marqueurs GSH pour des applications en imagerie biomédicale.

Le chapitre 2 porte sur la technique de diffusion Hyper-Rayleigh que nous avons utilisée pour la caractérisation optique des marqueurs. Après en avoir présenté le principe et le formalisme général, nous présentons les particularités liées à l'application de cette technique à des suspensions de nanocristaux. Les protocoles de mesures optiques, le montage expérimental utilisé ainsi que les techniques de caractérisations complémentaires sont aussi exposés.

Dans le chapitre 3, nous présentons les résultats des mesures de l'efficacité de GSH des marqueurs étudiés : BaTiO_3 , KNbO_3 , KTP, LiNbO_3 et ZnO . Nous commençons par une description générale des caractéristiques de ces différents types de nanomatériaux. Nous décrivons ensuite la démarche globale de mesure et nous nous intéressons tout particulièrement à sa validité, en identifiant les paramètres à prendre en compte pour une détermination fiable des coefficients optiques non linéaires moyens des nanocristaux. Les résultats obtenus par cette approche, qui essaie de quantifier l'influence de la taille et de la forme des nanocristaux, sont ensuite présentés et discutés.

Le chapitre 4 décrit les mesures aboutissant à l'identification des composantes indépendantes du tenseur optique non linéaire de second ordre des nanocristaux. Des mesures résolues en polarisation ont ainsi été effectuées. Leur analyse est présentée et discutée dans cette section. Par ailleurs, nous montrons dans une seconde partie l'influence de la forme des nanocristaux, à travers une étude de la réponse en polarisation réalisée sur des aiguilles d'iodate de fer en formation.

Le chapitre 5 porte sur la caractérisation de nanocristaux de ferrite de bismuth (BFO), un matériau multiferroïque dont l'utilisation est envisagée dans le cadre du projet pour la fabrication de sondes multifonctionnelles couplant, par exemple, les propriétés magnétiques et optiques non linéaires de ce matériau. Ces dernières sont très peu connues mais présentent a priori un fort potentiel pour le marquage optique. La caractérisation par diffusion Hyper-Rayleigh est ici appliquée à des nanocristaux de BFO afin d'obtenir une estimation de l'efficacité de GSH de ces marqueurs potentiels.

Génération de Second Harmonique de nanoparticules et applications en imagerie bio-médicale

Introduction

Le développement de l'imagerie biomédicale est un enjeu actuel majeur en biologie et en médecine. On peut citer par exemple la lutte contre le cancer qui nécessite des méthodes de diagnostic toujours plus performantes. De manière générale, l'amélioration des techniques d'imagerie, et en particulier l'imagerie optique, représente aussi un atout non négligeable pour l'étude et la compréhension du monde du vivant et des maladies.

La génération de second harmonique, appelée également doublage de fréquence, est un phénomène optique non linéaire qui présente un fort potentiel pour le développement de l'imagerie biomédicale. On envisage ainsi depuis peu de réaliser du marquage biologique grâce à des nanoparticules, dont la taille favorise une bonne interaction avec les milieux biologiques et pour lesquelles les propriétés de doublage de fréquence permettent une détection aisée en microscopie.

L'objectif de ce premier chapitre est donc de présenter les propriétés de génération de second harmonique des nanoparticules considérées et de démontrer leur intérêt pour des applications en imagerie biologique. Dans une première partie, nous introduirons les fondamentaux de l'optique non linéaire ainsi que les formalismes qui seront utilisés dans la suite de ce manuscrit. Une seconde partie décrira brièvement les dernières avancées en microscopie optique pour des applications biologiques avant de présenter un état de l'art sur l'utilisation de nano-marqueurs à doublage de fréquence pour l'imagerie biomédicale, en considérant les avantages intrinsèques à l'optique non linéaire.

I Optique Non Linéaire et Génération de Second Harmonique

L'Optique Non Linéaire (ONL) correspond à l'étude de la réponse optique des matériaux lorsqu'ils sont soumis à une lumière très intense. L'ONL est un domaine qui est apparu peu après l'invention du laser et la première observation de Génération de Second Harmonique (GSH) par Franken et al. date de 1961 [Franken 61].

Dans un premier temps, nous présenterons une courte description des phénomènes ONL, nous permettant d'introduire les formalismes que nous utiliserons par la suite. Ensuite, nous décrirons de manière plus précise les propriétés ONL de second ordre, qui sont à l'origine de la Génération de Second Harmonique. Enfin, nous nous intéresserons en particulier à la GSH au niveau microscopique, ce qui permettra de mieux saisir les enjeux des études propres aux nanocristaux.

I.1 Introduction à l'optique non linéaire

♦ Interaction lumière-matière

Les phénomènes optiques non linéaires sont dus aux interactions lumière-matière lorsque le champ électromagnétique incident est intense. Un matériau soumis à une onde lumineuse correspond à un ensemble de charges qui oscillent sous l'effet d'un champ incident. Ce champ va entraîner l'apparition de dipôles électriques, créant ainsi une polarisation macroscopique dans le matériau. Chacun de ces dipôles en vibration émet à son tour un rayonnement. A l'échelle macroscopique, la somme de ces rayonnements est à l'origine d'une nouvelle onde électromagnétique qui s'ajoute à l'onde incidente.

♦ De l'optique linéaire à l'optique non linéaire

En optique linéaire, la polarisation macroscopique P du matériau générée par un champ E est proportionnelle à ce champ.

$$P = \varepsilon_0 \chi E \quad (1.1)$$

$$\text{avec } \begin{cases} \chi \text{ la susceptibilité électrique du matériau,} \\ \varepsilon_0 \text{ la permittivité du vide.} \end{cases}$$

Dans ce cas, la fréquence de l'onde émise par rayonnement est la même que celle de l'onde incidente.

Lorsque l'intensité du champ incident est élevée, on observe des effets non linéaires : le matériau ne répond pas de manière proportionnelle à l'excitation. La polarisation macroscopique comprend alors des composantes non-linéaires qui s'ajoutent à la composante linéaire initiale telles que :

$$P = \varepsilon_0 (\chi E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots) \quad (1.2)$$

que l'on peut également écrire :

$$P = P^{(1)} + P^{(2)} + P^{(3)} + \dots$$

$$\text{avec } \begin{cases} \chi^{(2)}, \chi^{(3)} \text{ les susceptibilités électriques non linéaires d'ordre 2 et 3 respectivement,} \\ P^{(1)} \text{ la polarisation linéaire,} \\ P^{(2)}, P^{(3)} \text{ les polarisations non linéaires d'ordre 2 et 3 respectivement.} \end{cases}$$

Dans ce cas, l'onde électromagnétique émise par rayonnement dipolaire peut avoir une fréquence différente de l'onde incidente.

♦ Phénomène du doublage de fréquence

La génération de second harmonique (GSH) est un phénomène optique non linéaire d'ordre 2, c'est-à-dire qui est issu de la polarisation d'ordre 2, $P^{(2)}$. Pour une onde incidente de fréquence ω_1 dont le champ physique réel est défini par :

$$E(\omega_1) = E_1(\omega_1) + E_1^*(\omega_1) = E_1 e^{-i(\omega_1 t)} + E_1 e^{i(\omega_1 t)}$$

On a :

$$E^2(\omega_1) = E_1^2 (2 + e^{-i(2\omega_1 t)} + e^{i(2\omega_1 t)}) = 2E_1^2 + E(2\omega_1)$$

Cela implique une polarisation du second ordre telle que :

$$P^{(2)} = \varepsilon_0 \chi^{(2)} (2E_1^2 + E(2\omega_1))$$

Le terme $2E_1^2$ décrit une polarisation constante du matériau n'entraînant pas de rayonnement. On appelle ce phénomène la Rectification Optique.

Le second terme $E(2\omega_1)$ correspond à la polarisation qui est à l'origine du rayonnement à la fréquence double, autrement dit la GSH. La polarisation étant proportionnelle au carré du champ incident, cela implique que l'intensité de GSH émise est proportionnelle au carré de l'intensité incidente.

La GSH peut également être représentée par l'interaction de deux photons de même fréquence ω_1 avec le matériau, entraînant la génération d'un troisième photon de fréquence double, comme le montre la figure 1.1.

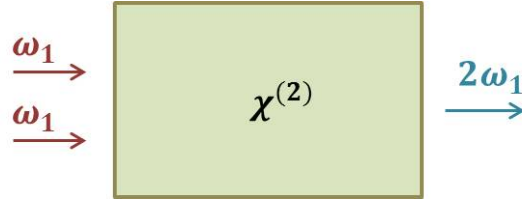


Figure 1.1 – Représentation de la Génération de Second Harmonique

◊ Notion d'accord de phase

Dans un matériau, nous avons vu que la GSH est émise de manière cohérente par des dipôles sous l'effet d'une onde excitatrice. Cette onde incidente n'excite pas tous les dipôles en même temps mais au fur et à mesure qu'elle se propage à travers le matériau. Cela signifie que chaque dipôle génère une onde à la fréquence double en phase avec l'onde excitatrice lors de son passage et l'onde GSH globale générée par le matériau est la somme de chacune de ces ondes. Or, la vitesse de propagation de l'onde à la fréquence double n'est pas la même que celle de l'onde incidente. Cette différence de phase est à l'origine d'interférences constructives ou destructives des ondelettes GSH générées par tous les dipôles. L'onde GSH globale va ainsi voir son intensité varier en fonction de la longueur traversée du matériau.

L'intensité de second harmonique générée à une longueur z du matériau s'écrit :

$$I_{2\omega}(z) \propto \chi^{(2)} I_{\omega}^2 z^2 \text{sinc}^2 \left(\frac{\Delta k z}{2} \right)$$

$$\text{avec : } \begin{cases} I_{\omega} \text{ intensité de l'onde excitatrice} \\ \Delta k = k_{2\omega} - 2k_{\omega} \text{ la différence de phase.} \end{cases}$$

Dans le cas particulier de l'accord de phase, correspondant à $\Delta k = 0$, toutes les ondelettes GSH s'additionnent constructivement et l'intensité de GSH augmente quadratiquement avec la longueur du matériau, soit $I^2 \propto z^2$. En général, il n'y a pas accord de phase et cette propriété n'est pas respectée. On définit alors la longueur de cohérence l_c pour laquelle l'intensité de GSH est maximale :

$$l_c = \frac{\pi}{\Delta k} = \frac{\lambda_{\omega}}{4(n_{2\omega} - n_{\omega})}$$

Le tableau 1.1 présente les longueurs de cohérence de certains matériaux étudiés dans le cadre de ce travail. On constate que l'ordre de grandeur est le μm , ce qui signifie qu'en dessous de cette taille, toutes les ondelettes GSH s'additionnent de manière constructive.

 Tableau 1.1 – Indices de réfraction de matériaux optiques non linéaires aux longueurs d'onde de 532 et 1064 nm *extraits de [Bass 09]* et longueurs de cohérence associées.

	n_{532}	n_{1064}	$\Delta k \text{ [nm}^{-1}\text{]}$	$l_c \text{ [}\mu\text{m]}$
BaTiO ₃	2,47	2,38	$1,06.10^{-3}$	2,96
KNbO ₃	2,2	2,12	$9,45.10^{-4}$	3,33
KTP	1,78	1,74	$4,72.10^{-4}$	6,65
LiNbO ₃	2,32	2,23	$1,06.10^{-3}$	2,96
ZnO	2,03	1,94	$1,06.10^{-3}$	2,96
SiC-3C	2,67	2,59	$9,45.10^{-4}$	3,33

Ainsi, lorsque l'on travaille avec des nanoparticules, leur taille est nettement inférieure à cette longueur de cohérence. Le phénomène d'accord de phase n'entre donc pas en compte dans l'observation de la GSH pour notre étude.

◊ Conventions, notations, unités

Nous introduisons ici une autre notation caractérisant les propriétés ONL de second ordre, qui sera utilisée préférentiellement dans ce manuscrit : le coefficient non linéaire d ou sa notation tensorielle d_{ijk} . Celle-ci est généralement utilisée dans les conditions de Kleinman et est reliée au tenseur $\chi^{(2)}$ par un facteur qui varie selon la convention. Les conventions utilisées dans la littérature pour décrire les processus optiques non linéaires peuvent varier d'un groupe à l'autre. Afin d'éviter les confusions, une comparaison de ces conventions est présentée par [Kuzyk 98]. Ici, nous choisissons la convention I, pour laquelle on a pour un phénomène de GSH :

$$P = \frac{1}{2}\varepsilon_0\chi^{(2)}E^2 = \varepsilon_0dE^2 \quad (1.3)$$

avec l'équivalence en notation matricielle :

$$d_{ijk} = \frac{1}{2}\chi_{ijk}^{(2)} \quad (1.4)$$

Par ailleurs, dans la suite de ce manuscrit, nous simplifierons l'écriture de la polarisation en omettant volontairement le facteur ε_0 . La permittivité du vide devra cependant être prise en compte dans les calculs. On rappelle que $\varepsilon_0 = 8,854.10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$.

Le système d'unité choisi ici est le système d'unités international. Dans la littérature, les valeurs des coefficients optiques non linéaires sont parfois données dans le système CGS en [esu]. Dans ce système, la permittivité du vide n'entre pas dans l'expression de la polarisation. Pour effectuer la conversion, il est nécessaire de changer d'unités et d'inclure la permittivité du vide [Kuzyk 98]. La conversion pour une hyperpolarisabilité de second ordre, grandeur que l'on définira par la suite, est telle que :

$$1 \text{ esu}_{(CGS)} = \frac{3,7088.10^{-21} \text{ Cm}^3 \text{ V}^{-2}}{8,854.10^{-12} \text{ F.m}^{-1}} = 4,189.10^{-10} \text{ m}^4 \text{ V}_{(SI,I)}^{-1}$$

I.2 Propriétés ONL de second ordre

I.2.a Susceptibilité non linéaire d'ordre 2

Dans le cas général d'une interaction non linéaire d'ordre 2, deux ondes de fréquences ω_n et ω_m provoquent la génération d'une troisième onde de fréquence $\omega_n + \omega_m = \omega_{n+m}$, comme schématisé dans la figure 1.2.

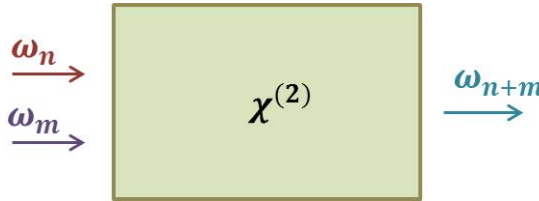


Figure 1.2 – Phénomène optique non linéaire d'ordre 2.

Dans la convention I (définie par l'eqn. 1.3), la polarisation non linéaire à cette fréquence somme est notée [Boyd 92] :

$$P_i(\omega_{n+m}) = \sum_{jk} \sum_{(mn)} d_{ijk}(\omega_{n+m}; \omega_n, \omega_m) E_j(\omega_n) E_k(\omega_m) \quad (1.5)$$

Les indices ijk correspondent aux composantes x, y ou z d'un repère cartésien dans lequel sont définis les champs.

La susceptibilité non linéaire $d_{ijk}(\omega_{n+m}; \omega_n, \omega_m)$ est un tenseur de rang 3 possédant 27 éléments. On peut également écrire l'équation précédente comme suit :

$$P_i(\omega_{n+m}) = D \sum_{jk} d_{ijk}(\omega_{n+m}; \omega_n, \omega_m) E_j(\omega_n) E_k(\omega_m) \quad (1.6)$$

Le facteur D , qui correspond à $\sum_{(nm)}$, est égal au nombre de permutations distinctes sur les fréquences. Par exemple, pour un processus de sommation de fréquence où ω_1 et ω_2 provoquent la génération d'une troisième onde de fréquence ω_3 , on a $D = 2$. Pour un processus de génération de second harmonique, $\omega_n = \omega_m = \omega$ et $D = 1$.

La polarisation non linéaire peut aussi s'écrire sous forme matricielle, à l'aide de la notation matricielle du tenseur de susceptibilité non linéaire d_{ijk} donnée dans le repère (x, y, z) où les champs sont définis. Les indices ijk du tenseur sont notés dans ce repère par $1 = x, 2 = y, 3 = z$.

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix}_{\omega_{n+m}} = D \begin{bmatrix} d_{111} & d_{112} & d_{113} & d_{121} & d_{122} & d_{123} & d_{131} & d_{132} & d_{133} \\ d_{211} & d_{212} & d_{213} & d_{221} & d_{222} & d_{223} & d_{231} & d_{232} & d_{233} \\ d_{311} & d_{312} & d_{313} & d_{321} & d_{322} & d_{323} & d_{331} & d_{332} & d_{333} \end{bmatrix}_{\omega_{n+m}} \begin{bmatrix} E_x(\omega_n) E_x(\omega_m) \\ E_x(\omega_n) E_y(\omega_m) \\ E_x(\omega_n) E_z(\omega_m) \\ E_y(\omega_n) E_x(\omega_m) \\ E_y(\omega_n) E_y(\omega_m) \\ E_y(\omega_n) E_z(\omega_m) \\ E_z(\omega_n) E_x(\omega_m) \\ E_z(\omega_n) E_y(\omega_m) \\ E_z(\omega_n) E_z(\omega_m) \end{bmatrix}$$

Il y a permutation sur les indices j et k puisque la polarisation non linéaire issue du produit $E_j(\omega_n) E_k(\omega_m)$ est équivalente à celle issue de $E_k(\omega_m) E_j(\omega_n)$, c'est-à-dire que $d_{ijk} = d_{ikj}$. Chaque ligne du tenseur ne comporte plus que 6 éléments indépendants soit 18 éléments indépendants au total.

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix}_{\omega_{n+m}} = D \begin{bmatrix} d_{111} & d_{122} & d_{133} & d_{123} & d_{113} & d_{112} \\ d_{211} & d_{222} & d_{233} & d_{223} & d_{213} & d_{212} \\ d_{311} & d_{322} & d_{333} & d_{323} & d_{313} & d_{312} \end{bmatrix}_{\omega_{n+m}} \begin{bmatrix} E_x(\omega_n) E_x(\omega_m) \\ E_y(\omega_n) E_y(\omega_m) \\ E_z(\omega_n) E_z(\omega_m) \\ E_y(\omega_n) E_z(\omega_m) + E_z(\omega_n) E_y(\omega_m) \\ E_x(\omega_n) E_z(\omega_m) + E_z(\omega_n) E_x(\omega_m) \\ E_x(\omega_n) E_y(\omega_m) + E_y(\omega_n) E_x(\omega_m) \end{bmatrix}$$

◇ Notation contractée

La notation est alors simplifiée grâce à la contraction $d_{ijk} = d_{il}$ avec les correspondances suivantes :

jk	11	22	33	23=32	31=13	12=21
l	1	2	3	4	5	6

Le tenseur de susceptibilité non linéaire peut donc être représenté de la manière suivante :

$$d_{il} = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{bmatrix}$$

◇ Hypothèse de Kleinman

L'hypothèse de Kleinman correspond au cas où les fréquences optiques sont très inférieures aux fréquences de résonance du matériau. Cela implique une interaction lumière-matière sans perte et instantanée. Dans ces conditions, la permutation est possible sur tous les indices :

$$d_{ijk} = d_{jki} = d_{kij} = d_{ikj} = d_{jik} = d_{kji} \quad (1.7)$$

Le tenseur d_{ijk} ne comporte alors plus que 10 éléments indépendants.

$$d_{ijk} = \begin{bmatrix} d_{111} & d_{122} & d_{133} & d_{123} & d_{113} & d_{112} \\ d_{112} & d_{222} & d_{233} & d_{223} & d_{123} & d_{122} \\ d_{113} & d_{223} & d_{333} & d_{233} & d_{133} & d_{123} \end{bmatrix}$$

Avec

$$\text{avec} \begin{cases} d_{211} = d_{112} \\ d_{213} = d_{123} \\ d_{212} = d_{122} \\ d_{311} = d_{113} \\ d_{322} = d_{223} \\ d_{323} = d_{233} \\ d_{313} = d_{133} \\ d_{312} = d_{123} \end{cases} \text{ équivalent à } \begin{cases} d_{21} = d_{16} \\ d_{25} = d_{14} \\ d_{26} = d_{12} \\ d_{31} = d_{15} \\ d_{32} = d_{24} \\ d_{34} = d_{23} \\ d_{35} = d_{13} \\ d_{36} = d_{14} \end{cases} \text{ en notation contractée.}$$

◇ Génération de Second Harmonique

Dans le cas particulier de la génération de second harmonique, avec pour fréquence incidente ω et fréquence générée $\omega_2 = 2\omega$, l'équation (1.5) devient :

$$P_i(2\omega) = \sum_{jk} d_{ijk}(2\omega; \omega, \omega) E_j(\omega) E_k(\omega) \quad (1.8)$$

La notation matricielle de la polarisation non linéaire dans les conditions de Kleinman donne :

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix}_{2\omega} = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{16} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{14} & d_{12} \\ d_{15} & d_{24} & d_{33} & d_{23} & d_{13} & d_{14} \end{bmatrix}_{2\omega} \begin{bmatrix} E_x^2(\omega) \\ E_y^2(\omega) \\ E_z^2(\omega) \\ 2E_y(\omega)E_z(\omega) \\ 2E_x(\omega)E_z(\omega) \\ 2E_x(\omega)E_y(\omega) \end{bmatrix} \quad (1.9)$$

I.2.b Symétrie cristalline

Le tenseur de susceptibilité non linéaire est lié à la symétrie de la structure cristalline du matériau. Par simplicité, le tenseur est défini dans le repère du cristal. Cela signifie par exemple que si le cristal possède un axe de symétrie d'ordre 4 autour de son axe z, c'est-à-dire que la structure cristalline est la même selon les axes x et y, les propriétés optiques non linéaires vont également posséder cette symétrie. On a alors, dans ce repère, l'équivalence $d_{zxx} = d_{zyy}$. A chaque classe cristalline ou groupe ponctuel de symétrie correspond donc une forme de tenseur particulière dont certains coefficients d_{il} sont égaux entre eux et d'autres s'annulent.

Les structures cristallines qui comprennent un centre de symétrie n'ont pas de propriétés ONL de second ordre, autrement dit, le tenseur d_{il} correspondant est nul [Boyd 92]. En effet, pour un matériau centrosymétrique, si un champ électrique E génère une polarisation P, le champ de signe opposé -E génère une polarisation égale et opposée à la première, -P. Par exemple, pour un processus de GSH :

$$-P = \chi^{(2)}[-E]^2 = \chi^{(2)}E^2 = P$$

La seule solution de cette équation est $\chi^{(2)} = 0$, soit un tenseur nul.

Certains matériaux ne possèdent pas de centre de symétrie, ils sont appelés non-centrosymétriques. C'est cette particularité qui leur procure les propriétés ONL de second ordre et en particulier celle de GSH qui nous intéresse ici.

Les tenseurs des principaux matériaux étudiés ensuite sont répertoriés dans le tableau (1.2).

Tableau 1.2 – Tenseur de susceptibilité d'ordre 2 pour quelques classes cristallines, et équivalences dans les conditions de Kleinman. *Extrait de [Boyd 92]*.

Classe cristalline	Tenseur (d_{il}) sous forme matricielle	conditions de Kleinman	Matériaux
6mm, 4mm	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$d_{15} = d_{31}$	ZnO, BaTiO ₃
6	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{15} & d_{14} & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$\begin{cases} d_{14} = 0 \\ d_{15} = d_{31} \end{cases}$	Fe(IO ₃) ₃
mm2	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{24} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$\begin{cases} d_{15} = d_{31} \\ d_{24} = d_{32} \end{cases}$	KNbO ₃ , KTP
3m	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & -d_{22} \\ -d_{22} & d_{22} & 0 & d_{15} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$d_{15} = d_{31}$	LiNbO ₃ , BiFeO ₃
$\bar{4}3m$	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & d_{14} \end{pmatrix}$		3c-SiC, Bi ₂₅ FeO ₄₀

I.3 Moment dipolaire induit et polarisabilité moléculaire

Lorsqu'une molécule est excitée par un champ électrique local E_{loc} , le moment dipolaire moléculaire induit p est défini par la relation :

$$p = \alpha E_{loc} + \beta E_{loc}^2 + \gamma E_{loc}^3 + \dots \quad (1.10)$$

Cette relation est l'équivalence à l'échelle microscopique de la relation (1.2) avec α la polarisabilité électronique linéaire de la molécule, β et γ les hyperpolarisabilités de premier et de second ordre respectivement de cette molécule. Rappelons ici que l'on se place dans la convention I (cf. § 1.1). Le moment dipolaire moléculaire de second ordre pour un phénomène de second harmonique (SH) s'écrit alors :

$$p^{(2\omega)} = \beta E_{loc}^2 \quad (1.11)$$

◊ Facteur de champ local et relation de Lorentz-Lorenz

Une molécule soumise à un champ est rarement isolée dans l'air. Son milieu environnant modifie les propriétés du champ incident du fait de l'interaction lumière-matière et des effets de polarisation et de champs de réaction qui en résultent [Kuzyk 98]. Le champ effectif E_{lc} vu par la molécule diffère du champ incident E par un facteur de champ local f_ω tel que $E_{lc} = f_\omega E$, qui dépend des propriétés diélectriques du milieu environnant. La relation de Lorentz-Lorenz relie les champs macroscopique et microscopique dans un liquide homogène non dipolaire d'indice de réfraction n :

$$E_{lc} = \frac{n^2(\omega) + 2}{3} E$$

L'hyperpolarisabilité moléculaire β_{mol} est reliée au coefficient macroscopique d par ces facteurs de champ local. Elle est définie pour un phénomène de second ordre par [Zyss 82] :

$$d = N_{mol} f_\omega^2 f_{2\omega} \beta_{mol} \quad (1.12)$$

avec N_{mol} le nombre de molécules par unité de volume émettant de manière cohérente. Le coefficient d représente donc les propriétés ONL pour une unité de volume du système.

Nous utiliserons également la notation F_l pour exprimer le facteur de champ local dans le cas de la génération de second harmonique.

$$F_l = f_\omega^2 f_{2\omega} \quad (1.13)$$

Conclusion

Dans cette première partie, nous avons décrit les propriétés optiques non linéaires et plus particulièrement la GSH. Nous avons pu voir que ce phénomène entraîne l'émission d'une onde à la fréquence double sous illumination intense et pour laquelle l'intensité émise est proportionnelle au carré de l'intensité incidente. Ce processus optique est caractérisé par une grandeur appelée susceptibilité non linéaire d'ordre 2 ou encore, au niveau moléculaire, hyperpolarisabilité. De nature tensorielle, cette caractéristique dépend de la structure cristalline du matériau. On peut aussi signaler que ce phénomène est inhérent à toute non-centrosymétrie et en particulier celle propre aux cristaux non-centrosymétriques. Nous verrons par la suite en quoi ces propriétés optiques sont intéressantes pour des applications en imagerie biomédicale.

II Applications en biologie : marquage et imagerie

Introduction

La seconde partie de ce chapitre est destinée à présenter l'intérêt et les enjeux de l'utilisation de nanoparticules GSH en imagerie biomédicale, afin de mieux appréhender les motivations de ce travail de recherche. Nous nous intéresserons dans un premier temps à la microscopie multiphotonique qui est une technique novatrice pour imager les milieux biologiques. Après en avoir exposé le principe et les enjeux, quelques exemples d'applications seront présentés de manière à illustrer la portée de cette technique, puis l'utilisation de marqueurs pour l'imagerie optique sera abordée. La seconde partie portera sur le marquage biologique par des nanoparticules GSH en faisant état des avantages de ces marqueurs dans ce contexte, des technologies utilisées, des types de nanoparticules et enfin des résultats obtenus à ce jour. Nous terminerons par une présentation succincte d'autres types de marqueurs qui, bien que non étudiés dans le cadre de ce travail, nous semblent pertinents pour le développement de l'imagerie biomédicale.

II.1 Microscopie multiphotonique

II.1.a Principe et enjeux en imagerie biomédicale

En biologie, la microscopie optique classique est habituellement confrontée à des difficultés telles que l'endommagement des échantillons par photo-dégradation, la difficulté à imager en profondeur ou encore la résolution spatiale. La microscopie confocale [Shotton 89] a permis de contourner certains obstacles. En particulier, la résolution spatiale est améliorée au moyen de trous confocaux, dont l'un permet de limiter l'angle d'excitation et l'autre, utilisé pour la détection, laisse passer uniquement la lumière issue d'un point précis de l'échantillon. Couplée à un système de balayage, la microscopie confocale permet alors de reconstruire une image de l'échantillon en trois dimensions avec une résolution élevée.

Plus récemment, une nouvelle technique de microscopie est apparue suite aux travaux de [Denk 90] : la microscopie multiphotonique. Cette technique offre de nouvelles possibilités en terme d'imagerie, grâce notamment à l'utilisation de différents processus optiques tels que la fluorescence à deux-photons (2PF, pour "2-Photon Fluorescence") et à 3 photons (3PF), les phénomènes optiques non linéaires comme la GSH, la génération de troisième harmonique (GTH) ou le mélange quatre ondes (FWM, pour "four wave mixing"), et la diffusion Raman, qu'elle soit cohérente (CARS, pour "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering") ou stimulée (SRS, pour "Stimulated Raman Scattering") [Zipfel 03]. Comme décrit ci-après, la microscopie multiphotonique est très prometteuse dans le domaine des applications biomédicales.

◇ Principe

Une manière assez simple de décrire le principe de la microscopie multi-photonique consiste à se baser sur la comparaison des phénomènes de fluorescence et de fluorescence à deux-photons.

La fluorescence est un phénomène optique de type luminescent. Elle est émise par des matériaux ou molécules dans lesquelles certaines transitions entre deux états électroniques peuvent s'effectuer par absorption ou émission de photons. La figure 1.3 (a) décrit ces interactions. Dans un premier temps, l'absorption d'un photon entraîne la transition de l'état électronique fondamental ou initial à l'état excité. Un phénomène de relaxation vibrationnelle, de type non radiatif, peut se produire de manière à atteindre le niveau le plus bas de l'état électronique excité. Enfin, une dernière transition est nécessaire pour retrouver l'état de plus faible énergie. Lorsque cette désexcitation s'effectue par l'émission d'un photon, c'est ce que l'on appelle l'émission de fluorescence. L'énergie de ce photon est prédéfinie puisqu'elle est déterminée par la transition énergétique entre les deux états mis en jeu.

Cette émission de fluorescence est produite par l'excitation d'un photon, d'énergie égale ou supérieure à la bande d'absorption de la transition correspondante. Or il est possible d'exciter ce même échantillon par l'absorption simultanée de deux photons de plus faible énergie, mais dont la somme permet effectivement l'excitation, comme le montre la figure 1.3 (b). Ce type de fluorescence, appelé fluorescence à 2 photons se produit à condition que les deux photons arrivent au même endroit en même temps. L'émission de fluorescence, qu'elle soit excitée à 1 ou 2 photons, aura dans les deux cas la même énergie.

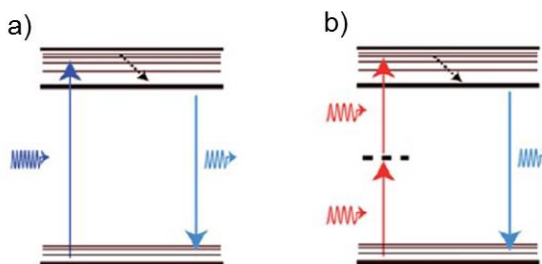


Figure 1.3 – Fluorescence excitée (a) à un photon, (b) à deux photons. *Extrait de [Bonacina 12].*

Il est ainsi possible d'exciter un échantillon avec une énergie lumineuse inférieure à son énergie d'activation intrinsèque, c'est-à-dire en utilisant une longueur d'onde supérieure. C'est en exploitant cette propriété que la microscopie biphotonique permet de contourner de nombreux inconvénients de la microscopie classique. Ce phénomène d'absorption simultanée de deux photons a donné son nom à la microscopie biphotonique, mais il peut également se manifester avec trois photons ou plus et l'on parle alors de microscopie multiphotonique.

◇ Enjeux

Les enjeux en imagerie biomédicale sont nombreux puisque les avantages de la microscopie biphotonique permettent de repousser les limites actuelles de la microscopie classique. Dans cette partie, nous détaillons ces avantages.

On peut citer tout d'abord l'**amélioration de la résolution spatiale**. En effet, les conditions selon lesquelles deux photons de même énergie doivent arriver en même temps impliquent une plus faible probabilité d'excitation. Cette faible probabilité doit être compensée par une intensité d'excitation élevée, ce qui est fait au moyen d'un faisceau laser focalisé. Le processus optique est alors limité spatialement par l'intensité d'excitation : il reste confiné au point focal. Cette région étant inférieure à la limite de diffraction, la résolution spatiale ainsi obtenue est meilleure que celle obtenue en microscopie confocale. Un système de balayage complémentaire permet, comme en microscopie confocale, d'obtenir une image complète d'un échantillon avec une résolution spatiale très élevée.

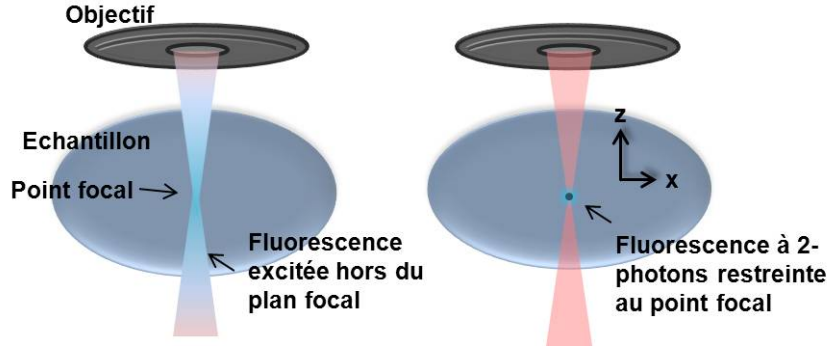


Figure 1.4 – Microscopie classique (à gauche) et microscopie biphotonique (à droite) avec amélioration de la résolution spatiale. Le couplage à un système de balayage permet d’imager en 3 dimensions.

En microscopie à un photon, la résolution spatiale vaut $r_{1p} = \frac{0,6\lambda}{ON}$, ON étant l’ouverture numérique du système, tandis que la résolution latérale à deux photons est plus fine et vaut $r_{2p} = \frac{0,5\lambda}{ON}$. Concernant la profondeur de champ (Depth Of Field, DOF), elle est de $DOF_{1p} = \frac{4\lambda}{ON^2}$ à un photon et est restreinte à seulement $DOF_{2p} = \frac{1,3n\lambda}{ON^2}$ à deux photons, ce qui améliore considérablement la résolution selon l’axe z .

Par ailleurs, cette technique permet d’**augmenter la profondeur de pénétration dans les tissus**. La possibilité d’exciter des échantillons à des longueurs d’onde supérieures à celles habituellement utilisées permet de travailler dans des zones où l’absorption des tissus n’est pas aussi importante que dans le visible. La fenêtre spectrale dite de transition biologique se situe dans le proche infra-rouge, entre 700 nm et 1000 nm, comme illustré sur la figure 1.5. En travaillant dans cette zone, le signal optique sera peu absorbé par l’échantillon biologique et pourra ainsi pénétrer plus profondément dans les tissus. Il est intéressant d’ajouter ici que la diffusion de la lumière joue un rôle important dans la profondeur de détection en microscopie biphotonique. Lorsque l’on prend en compte cet effet, on constate qu’il est souvent avantageux d’augmenter la longueur d’onde au-delà de cette fenêtre afin de travailler dans le domaine Infra-Rouge (IR) où les tissus diffusent beaucoup moins la lumière, même si l’eau absorbe plus.

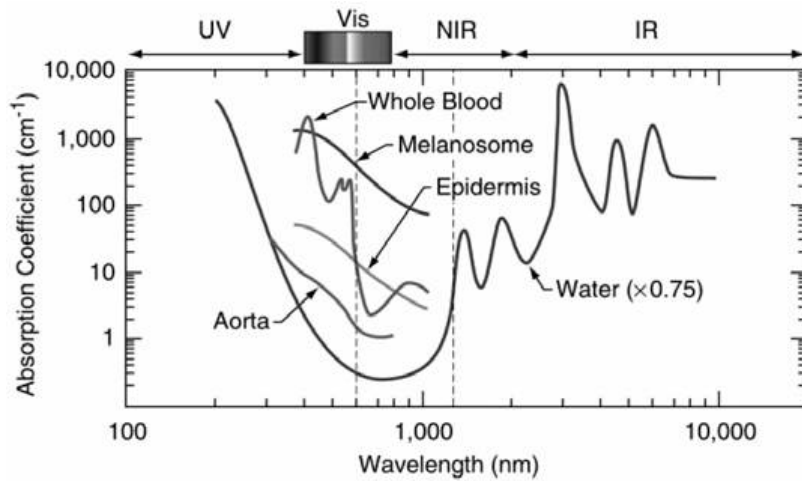


Figure 1.5 – Spectres d’absorption des principaux constituants des milieux biologiques. *Extrait du Bio-medical Photonics Handbook [Vo-Dinh 04].*

Enfin, la **photo-dégradation des échantillons peut être restreinte**. D’une part en raison de l’absorption moindre des tissus dans la zone de longueur d’onde utilisée, et d’autre part par la très faible zone spatiale d’excitation limitée au point focal. Il semble important d’ajouter que si les intensités laser employées doivent être élevées, les puissances moyennes peuvent être relativement faibles grâce à des lasers pulsés ultra-rapides, dont la durée de pulsation est de l’ordre de la femto-seconde.

Ces particularités offrent de nouvelles possibilités. Ainsi, l'imagerie non-invasive en profondeur présente un fort potentiel pour des zones sensibles et peu accessibles telles que le cerveau, ou encore pour l'étude des tissus épais, en dermatologie par exemple. En médecine, les champs d'application sont nombreux, allant de la simple imagerie permettant le diagnostic et le suivi de maladies à une utilisation comme assistance à la chirurgie ou aide à l'administration ciblée de médicaments.

II.1.b Exemples d'applications

Depuis une dizaine d'années, différentes utilisations de la microscopie multiphotonique en sciences de la vie ont été proposées [König 00], incluant des études photochimiques sur des cellules vivantes, des études d'endommagement cellulaire, la possibilité de réaliser des biopsies optiques non invasives ou encore l'utilisation pour de la nano-chirurgie. Associée à des techniques telles que la diffusion Raman (CARS ou SRS), l'imagerie multiphotonique permet également l'analyse biochimique de structures biologiques [Folick 11]. Les usages de cette technique sont par conséquent relativement variés. En cancérologie par exemple, elle permet de réaliser de l'imagerie simple de tumeurs et de métastases permettant le diagnostic et le suivi de cancers, mais également d'effectuer des études de dynamique cellulaire et d'interaction dans un micro-environnement tumoral, ce qui donne lieu à une meilleure compréhension de certains mécanismes immunitaires et permet alors d'améliorer les traitements thérapeutiques [Perry 12].

A l'heure actuelle, la microscopie multiphotonique est employée dans divers secteurs en recherche médicale et biologique parmi lesquels on peut citer les neurosciences [Ellis-Davies 11], l'ophtalmologie [Gibson 11], la dermatologie et étude des tissus [Kirejev 12], l'embryologie [Supatto 11], ou la pneumologie [Nava 10].

Plus précisément, de nombreux exemples d'applications, basés sur différents processus optiques tels que la GSH, la GTH, la 2PF ou le FWM sont décrits dans la littérature [Tong 11]. Parmi eux, une étude intéressante porte sur la reconstruction du lignage d'un embryon sans marqueur [Olivier 10] grâce aux propriétés optiques endogènes de 2PF, de GSH et de GTH des cellules. Les propriétés ONL endogènes telles que la GSH ou la GTH permettent par ailleurs des études structurales précises des tissus malgré la très faible intensité du signal, ou encore l'imagerie de l'activité électrique neuronale lorsqu'ils sont combinés à des agents de contraste électrochimiques [Campagnola 03, Mahou 11]. Un autre exemple en neurosciences présente une méthode d'imagerie de l'oxygène et du flux sanguin dans le cerveau [Lecoq 11].

La microscopie multiphotonique est également utilisée pour caractériser des infections ou maladies. Par exemple, l'étude de la forme du collagène grâce à ses propriétés de GSH endogène permet de quantifier la fibrose du foie lors de l'infection par l'hépatite C [Gailhouste 10]. Un autre exemple basé sur l'imagerie du système immunitaire permet d'étudier les infections pulmonaires [Fiole 11]. L'imagerie biphotonique est également un moyen de diagnostiquer le cancer, comme par exemple le cancer du poulmon [Pavlova 10].

Ces quelques exemples ne sont pas représentatifs de tout ce qui existe dans le domaine mais montrent bien que les particularités optiques de la microscopie multiphotonique lui confèrent un intérêt non négligeable en biologie et en médecine, et ce à différents niveaux : études fondamentales, diagnostic, suivi, voire également thérapie. Bien que les propriétés optiques endogènes de tissus, tels que le collagène, permettent d'accéder à des informations biologiques particulièrement intéressantes, il est souvent nécessaire d'utiliser des sondes exogènes. Ces marqueurs optiques, que nous présentons dans le paragraphe suivant, permettent entre autres de cibler des éléments biologiques spécifiques.

II.1.c Marqueurs optiques luminescents

Le développement des nanotechnologies permet une interaction mieux maîtrisée avec le monde du vivant, favorisant l'observation et la compréhension des processus biologiques : ingénierie des tissus, étude structurale d'ADN, etc. Ces avancées en biologie associées au développement de techniques de diagnostic et de thérapie sont à l'origine de progrès en médecine. Par exemple, la détection spécifique de protéines permet le diagnostic de maladie comme le cancer, et l'administration de médicaments et/ou de gènes est utilisée à des fins thérapeutiques.

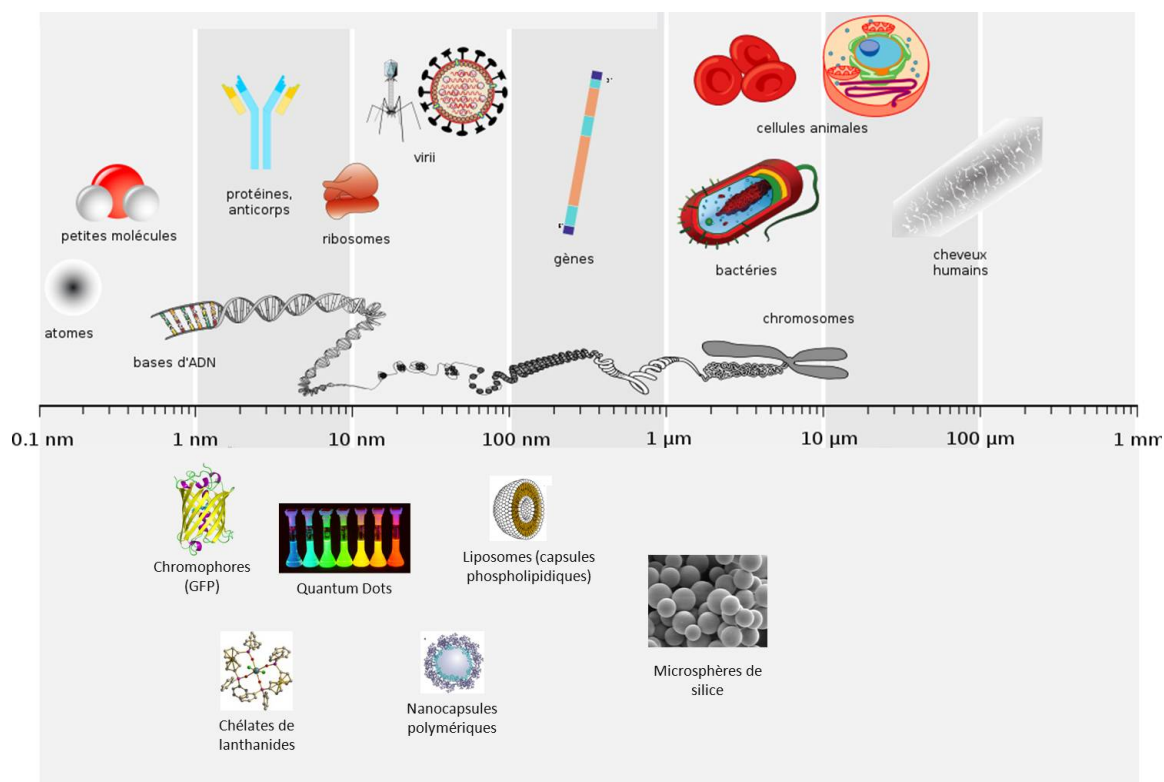


Figure 1.6 – Dimensions d'éléments biologiques en comparaison avec des marqueurs exogènes existants. Extrait de [Paumier 08].

De nombreux types de marqueurs existent pour de telles applications. Nous nous intéresserons ici aux marqueurs optiques uniquement. Les paramètres à prendre en compte dans le cadre d'applications biomédicales sont :

- Leur taille, qui dépend de l'application visée : de l'ordre du nm pour une interaction à l'échelle moléculaire, la taille des marqueurs peut atteindre quelques centaines de nm pour des applications à l'échelle cellulaire.
- Leurs caractéristiques optiques incluant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission et la photostabilité. Ces caractéristiques sont à comparer aux propriétés optiques des milieux biologiques.
- La biocompatibilité des marqueurs.

Les marqueurs optiques exogènes les plus utilisés actuellement sont fluorescents. Ce sont généralement des molécules ou particules, qu'on utilise pour leurs propriétés optiques afin de les détecter facilement. Le principe de la fluorescence a été présenté précédemment (cf fig. 1.3). Dans cette partie, les différents marqueurs fluorescents sont décrits puis leur utilisation en microscopie biphotonique est abordée.

◊ Les différents types de marqueurs luminescents

Les marqueurs fluorescents sont sélectionnés pour leur capacité à absorber la lumière d'excitation (coefficient d'extinction) et leur taux de conversion lumière absorbée - lumière émise élevée (rendement ou efficacité quantique). La photostabilité des marqueurs est également prise en compte.

Les sondes fluorescentes sont de nature et de tailles variées. Les sondes organiques ou fluorophores sont constituées de molécules fluorescentes [Mason 99, Drummen 12]. Leur taille moléculaire permet de marquer des protéines mais elles se photodégradent rapidement. Parmi celles-ci, la plus connue, la protéine "Green Fluorescent Protein" (GFP), est à l'origine une protéine naturelle de méduse qui a été clonée pour son utilisation en imagerie biologique. Une meilleure stabilité ainsi qu'un rendement quantique plus élevé est attribué à des sondes inorganiques de plus grande taille telles que les Quantum Dots (QDs) [Alivisatos 04, Michalet 05, Medintz 05] ou les nanoparticules de silicium [Erogbogbo 08]. D'autres

particules sont également utilisées pour leurs propriétés de luminescence un peu particulières. Il s'agit de nanocristaux dopés par des ions terres rares ou lanthanides. Les lanthanides sont également utilisés à l'échelle moléculaire sous forme d'ions chélatés [Hemmilä 05]. Le tableau 1.3 récapitule les caractéristiques optiques des principaux marqueurs luminescents. D'autres comparaisons plus détaillées de ces sondes luminescentes sont disponibles dans la littérature [Resch-Genger 08, Bouzigues 11].

A ces marqueurs s'ajoutent les particules encapsulantes constituées de microsphères de silice ou de nanosphères polymériques à l'intérieur desquelles se trouvent un ou plusieurs marqueurs optiques. L'utilisation de telles capsules a plusieurs avantages. En optique, la présence d'une capsule permet de regrouper plusieurs molécules fluorescentes afin d'augmenter l'intensité de signal. Il est également possible de regrouper différents types de marqueurs de manière à obtenir des "signatures" optiques spécifiques. De plus, l'encapsulation assure une meilleure stabilité du signal en évitant les interactions avec l'environnement, en particulier l'oxygène, généralement à l'origine du photoblanchiment [Ow 05, Ma 12]. Sur le plan médical, la co-encapsulation de médicaments et de marqueurs optiques permet d'associer un traçage optique à une délivrance de médicaments contrôlée [Couvreur 06].

D'autres marqueurs optiques, bien que non luminescents, sont également utilisés en imagerie biologique. Il s'agit de particules métalliques, principalement d'or ou d'argent, dont l'utilisation repose en grande partie sur leurs propriétés de diffusion de la lumière [Alivisatos 04]. A certaines longueurs d'onde spécifiques, dépendant de la taille et de la forme de la nanoparticule, l'intensité reçue est fortement amplifiée par excitation plasmonique. Ces structures sont utilisées pour des mesures de rapprochement de deux couples molécule - sonde, d'amplification de signal de fluorescence, ou encore de diffusion Raman (SERS, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) lors de l'adsorption de molécules à la surface de ces nanoparticules.

♦ Marqueurs fluorescents en imagerie biphotonique

Les marqueurs fluorescents peuvent être utilisés en microscopie multiphotonique. Cependant, l'efficacité d'absorption biphotonique n'est pas la même pour tous les marqueurs. Cette efficacité est importante puisqu'elle détermine la capacité d'un marqueur à être observé en imagerie biphotonique, sans que l'excitation ne soit trop intense pour les milieux biologiques. Les marqueurs fluorescents dont l'efficacité d'absorption biphotonique est la plus efficace sont les QDs [Larson 03]. Cependant, il apparaît que leur usage *in vivo* est souvent restreint en raison d'une toxicité élevée. De plus, bien qu'ayant des vitesses de photoblanchiment faibles par rapport à d'autres marqueurs, ce phénomène exclut toute application de suivi au-delà de quelques heures. Pour finir, les QDs peuvent clignoter ce qui limite ainsi des applications résolues en temps. Divers travaux ont été menés afin de réduire cet effet, avec succès pour certains, mais au détriment du seuil de photo-dégradation, nécessitant l'application de puissances lasers plus faibles [Wang 09].

Conclusion

La microscopie multiphotonique est une technique très prometteuse pour les applications biomédicales. La diversité des phénomènes optiques exploités par cette technique, telles que la fluorescence ou l'optique non linéaire, lui procure une large gamme d'utilisation. Aux phénomènes optiques endogènes s'ajoutent également l'usage de marqueurs exogènes, permettant d'élargir encore ses applications. Ces derniers, principalement fluorescents, présentent cependant certains inconvénients, particulièrement en ce qui concerne leur stabilité optique. L'emploi de marqueurs aux propriétés optiques non linéaires semble être une alternative intéressante dans ce contexte.

II.2 Marqueurs GSH : état de l'art

Dans cette section, nous faisons un état de l'art des marqueurs GSH et de leurs applications en imagerie biomédicale. On trouve actuellement dans la littérature quelques revues concernant ces marqueurs et leurs applications en imagerie biologique [Brasselet 10, Dempsey 12, Bonacina 12, Ladj 13].

Dans une première partie, les intérêts de l'utilisation de ces marqueurs sont énumérés en lien avec leurs propriétés optiques. Nous nous intéresserons ensuite à la microscopie de GSH utilisée pour la réalisation d'images, incluant la technologie et les techniques d'observation. Un troisième paragraphe présentera les

Tableau 1.3 – Propriétés et utilisation des marqueurs fluorescents. *Données extraites de [Lahmani 07].*

Nature	Taille	Durée de vie de fluorescence	Propriétés optiques	Applications	Limites
Fluorophores	Moléculaire	ns	<ul style="list-style-type: none"> - Emission du proche UV au proche IR selon le type de fluorophore - Large bande d'absorption - Recouvrement des spectres d'absorption et d'émission. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> (ou petit animal) - Mesures d'interaction FRET¹ - Mesures de mobilité FRAP² - Mesures d'interaction avec l'environnement (pH, concentration en ions etc) - Détection unique de molécules 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> possible uniquement avec des cyanines (émission IR) mais faible rendement quantique - Pas de multiplexage - Vitesse élevée de photoblanchiment
Chélates de lanthanides	Moléculaire	µs	<ul style="list-style-type: none"> - Séparation des bandes d'absorption et d'émission - Excitation dans le bleu - Absorption biphotonique 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> car auto-fluorescence des tissus élevée dans le bleu - Fluorescence retardée³ - Analyse biochimique : couplage avec des fluorophores pour des mesures d'interaction 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> envisageable seulement en biphotonique
Quantum Dots	2-10 nm	50-100 ns	<ul style="list-style-type: none"> - Large bande d'absorption - Bande d'émission étroite, fonction de la taille - Absorption biphotonique efficace - Emission IR > 950 nm avec structure cœur-coque - Photoblanchiment relativement lent 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> et petit animal - Marquage cellulaire - Multiplexage 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> restreint car toxicité élevée - Clignotement : faible stabilité du signal
Nanocristaux de terres rares dopées	100-500 nm	ms	<ul style="list-style-type: none"> - Séparation des bandes d'absorption et d'émission - Raies d'émission fines - « down-conversion » ou « up-conversion »⁴ - faible vitesse de photoblanchiment 	<ul style="list-style-type: none"> - Analyse biochimique et diagnostic <i>in vitro</i> : détection de virus, de protéines, d'antigènes. - Fluorescence retardée³ 	
<p>1 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) : Une molécule fluorescente préalablement excitée peut transférer son énergie et exciter ainsi un autre type de fluorophore, en fonction de la distance existante entre les deux molécules. La technique basée sur ce principe permet d'évaluer cette distance.</p> <p>2 Fluorescence Recovery After Bleaching (FRAP) : Le photoblanchiment est provoqué volontairement dans une zone précise. Le repeuplement de molécules fluorescentes permet d'évaluer ainsi leur mobilité.</p> <p>3 Fluorescence retardée : Un chélate, de longue durée de vie de fluorescence, transfère son énergie à un autre accepteur, qui seul, aurait une durée de vie beaucoup plus courte. Cette technique permet d'éliminer l'autofluorescence au moyen d'un éclaircissement pulsé et d'un filtrage temporel.</p> <p>4 Down-conversion : convertit une énergie élevée en une énergie plus faible, up-conversion : conversion d'une énergie en une énergie plus élevée.</p>					

nanoparticules utilisées dans ce contexte, incluant l'aspect fonctionnalisation nécessaire au marquage biologique. Pour finir, nous présenterons plus en détail les résultats récents des travaux d'imagerie biologique réalisés à ce jour.

II.2.a Intérêts des marqueurs GSH pour l'imagerie biomédicale

Comme nous l'avons vu précédemment, les marqueurs GSH offrent la possibilité de détecter un signal à la fréquence double du signal d'excitation. Le processus optique étant différent de la fluorescence à deux photons, les propriétés du signal émis ne sont donc pas les mêmes. La figure 1.7 présente une comparaison schématisée des deux phénomènes.

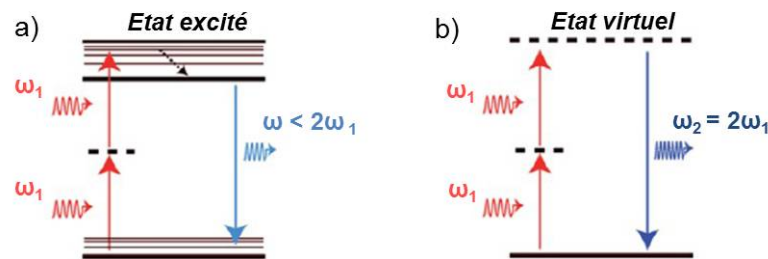


Figure 1.7 – Comparaison des phénomènes de (a) fluorescence à deux photons et de (b) génération de second harmonique. *Extrait de [Bonacina 12].*

Contrairement à la fluorescence, la génération de second harmonique n'implique pas d'absorption lumineuse par le matériau. C'est un phénomène cohérent, c'est-à-dire que l'onde émise est cohérente avec l'onde d'excitation ce qui explique le temps de réponse instantané de ce phénomène. De plus, comme ce processus implique des niveaux d'énergie dits virtuels, il est non-résonant. En d'autres termes, la GSH ne dépend pas de bandes d'énergie particulières du matériau : elle est effective quelle que soit la longueur d'onde d'excitation et sa réponse correspond exactement à la fréquence double de l'excitation.

Ces propriétés optiques intrinsèques font de ces particules des marqueurs biologiques à fort potentiel. Les intérêts particuliers pour l'imagerie sont détaillés dans la section suivante.

◊ Photostabilité

La GSH est un processus lumineux sans absorption d'énergie. On n'observe donc pas les effets de photodégradation qui y sont habituellement associés en fluorescence. De plus, il n'y a pas de clignotement possible comme pour les QDs. Le signal GSH est donc stable au cours du temps et sur de longues durées, comme démontré premièrement par [Le Xuan 08].

Dans un travail récent, [Staedler 12] présente l'évolution au cours du temps sous excitation continue, de la fluorescence issue de marqueurs FM1-43FX d'une part et de la GSH de nanoparticules non-centrosymétriques d'autre part (fig. 1.8). Le signal de fluorescence est devenu quasiment indétectable après 2h d'éclairement tandis que le signal de GSH reste stable pendant plus de 5h.

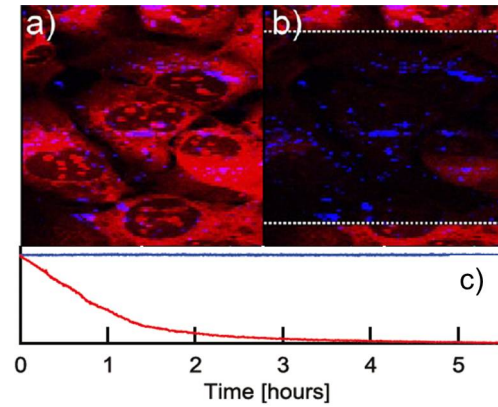


Figure 1.8 – Comparaison de la fluorescence (en rouge) et de la GSH (en bleu) sous excitation laser continue. En haut : image d’une culture cellulaire marquée par des particules GSH (a) en début d’excitation, (b) après 10 min d’excitation laser intense. En bas : évolution de la fluorescence et de la GSH en fonction du temps. *Extrait de [Staedler 12]*.

[Pantazis 10] a également comparé le signal GSH issu de particules de BaTiO_3 à la fluorescence de QDs (fig. 1.9) : le signal de GSH reste très stable tandis qu’on observe un effet de clignotement avec les QDs.

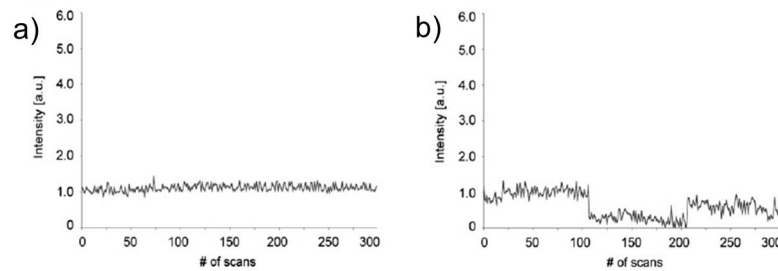


Figure 1.9 – Comparaison de signaux de GSH et de fluorescence sous excitation laser à 820 nm de faible intensité. (a) Signal de GSH de particules de BaTiO_3 et (b) signal de fluorescence de QDs CdSe/ZnS . *Extrait de [Pantazis 10]*.

La photostabilité des marqueurs GSH offre ainsi la possibilité d’effectuer des études à long terme ou en dynamique, par exemple le suivi de lignées cellulaires en différenciation dans un embryon.

◇ Flexibilité en longueur d’onde

La GSH étant un processus non résonant, la longueur d’onde d’émission ne dépend pas des bandes d’émission du matériau mais uniquement de la longueur d’onde d’excitation : comme le veut le principe de doublage de fréquence, la longueur d’onde d’émission est donc égale à la moitié de celle d’excitation. [Kachynski 08] le montre pour la première fois en excitant des nanocristaux de ZnO à deux longueurs d’onde différentes : 1064 nm et 850,6 nm. Un autre travail [Extermann 09] démontre également la possibilité d’exciter des nanocristaux GSH par deux sources distinctes à 800 et 1550 nm et exploite les avantages de cette propriété afin d’améliorer la profondeur de pénétration.

En effet, cette particularité présentée dans la figure 1.10, offre la possibilité de varier les longueurs d’onde d’excitation de manière à éviter les zones d’absorption des tissus biologiques qui se trouvent principalement en dessous de 700 nm (rappel fig. 1.5).

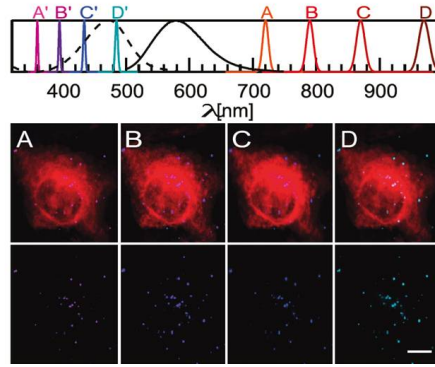


Figure 1.10 – Flexibilité en longueur d’onde des marqueurs. En haut : spectres d’excitation laser à différentes longueurs d’onde (A) 720 nm, (B) 790 nm, (C) 868 nm et (D) 970 nm et spectres d’émission GSH correspondants (A',B',C',D'). En bas : images de cellules HTB-182 avec agent de contraste fluorescent (en rouge) exposés à des nanocristaux GSH (en bleu), et excités aux différentes longueurs d’onde (A,B,C,D). La ligne du bas correspond aux mêmes images avec uniquement le signal de GSH. *Extrait de [Staedler 12].*

Travailler dans le domaine spectral infra-rouge permet, en évitant cette fenêtre d’absorption biologique, de pénétrer plus profondément dans les tissus. Les travaux de [Grange 11] démontrent qu’il est possible de détecter des marqueurs GSH à une profondeur de 120 μm sous excitation à 820 nm (fig. 1.11). De plus, la faible absorption optique des tissus biologiques entraîne une accumulation d’énergie moindre et donc une diminution de l’endommagement de ces tissus par laser.

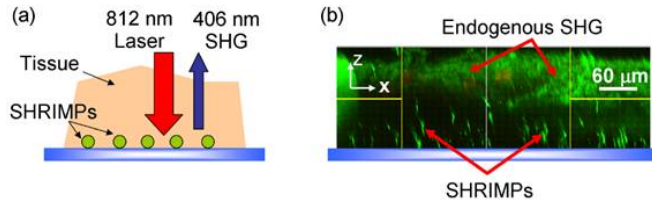


Figure 1.11 – Détection de marqueurs GSH en profondeur. (a) Schéma d’échantillon, (b) détection de marqueurs (ou SHRIMPS, acronyme anglais pour Second Harmonic Radiation IMaging ProbeS) de 300 nm sous une épaisseur de 120 μm d’un tissu de queue de souris. *Extrait de [Grange 11].*

◊ Intensité et contraste

Les phénomènes optiques non linéaires d’ordre 2 ont une réponse qui varie en fonction du carré de l’intensité d’excitation comme on l’a vu précédemment (cf. § 1.1). Ils nécessitent donc une excitation intense pour être détectés. Grâce à la technologie laser femto-seconde actuelle, il est possible d’obtenir une sensibilité suffisante sans endommager les tissus, par le moyen de pulses ultra-courts d’intensité élevée, dont l’énergie moyenne reste faible. Il semble important de préciser que les milieux biologiques sont plutôt sensibles aux intensités moyennes tandis que l’intensité d’émission de la GSH dépend elle de l’intensité crête d’excitation.

Concernant l’intensité absolue, [Hsieh 09] fait une comparaison de celle émise par des QDs fluorescents à 2-photons et celle de nanoparticules GSH. Il s’avère que l’efficacité optique est meilleure pour les QDs avec 47.10^3 GM^{-1} (1 $\text{GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{sec} \cdot \text{photon}^{-1}$) que pour des nanoparticules de BaTiO_3 de 120 nm avec 19.10^3 GM . Il est cependant intéressant de constater que l’ordre de grandeur est le même. Par ailleurs, la sensibilité optique n’est généralement pas une difficulté majeure pour les microscopes

1. unité Gopper-Mayert : l’efficacité est exprimée comme une section efficace de fluorescence à 2 photons pour une comparaison avec les QDs.

actuels, et d'autres particularités des nanoparticules GSH telles que la flexibilité en longueur d'onde ou la photostabilité sont également à prendre en compte.

Le contraste n'est pas un problème majeur pour l'imagerie de GSH. En effet, contrairement aux marqueurs fluorescents, les bandes spectrales d'excitation et d'émission sont étroites en GSH. Cela permet de rejeter le bruit de fond par le simple usage de filtres optiques. Grâce à cela, on réduit, voire on élimine l'influence de l'autofluorescence (fluorescence endogène due aux tissus biologiques), favorisant un fort contraste. La GSH endogène émise par certains types de collagènes ne peut pas être filtrée de cette manière. Cependant, [Pantazis 10] montre que cette source de GSH n'est pas particulièrement gênante puisqu'elle émet un signal beaucoup plus faible que celui émis par les marqueurs. Pour finir, le même groupe note que l'effet de saturation habituellement constaté avec les QDs fluorescents n'est pas observé avec les marqueurs GSH puisqu'il n'y a pas d'absorption. Il est donc possible d'améliorer le contraste en augmentant l'intensité d'excitation, tant que les tissus ne sont pas endommagés.

L'effet de l'excitation laser intense sur les tissus doit également être prise en compte. Une étude réalisée par [König 97] analyse l'effet de l'excitation laser à forte puissance sur les tissus biologiques et montre qu'en dessous de 1 mW, un faisceau laser femto-seconde fortement focalisé n'engendre pas de dommage cellulaire, ce qui correspond à une puissance crête de 100 GW.cm^{-2} . Par comparaison, les travaux de [Grange 11] sont effectués à une intensité dix fois plus faible que ce seuil, ce qui laisse une marge non négligeable pour amplifier encore la réponse des marqueurs.

◇ Conclusion

Les marqueurs GSH présentent des propriétés particulièrement intéressantes dans le cadre de l'imagerie : photostabilité, flexibilité en longueur d'onde pour une grande profondeur de pénétration, et excellent contraste. Les limites de l'usage de ces marqueurs optiques sont plutôt liées à la faible intensité émise. La technologie laser femto-seconde permet de palier avantageusement à cet inconvénient. Cependant, il est intéressant de noter que l'intensité GSH est proportionnelle au carré du volume des nanoparticules. Actuellement, il est donc difficile de faire de la détection unique de particules GSH très petites ce qui restreint les applications à du marquage extra-cellulaire.

II.2.b Microscopie de GSH : technologie

Le microscope de GSH est l'outil essentiel permettant de réaliser de l'imagerie biomédicale avec des marqueurs GSH. Le développement de cette technique repose sur des avancées technologiques que l'on présente ici brièvement.

La microscopie de GSH fait appel à des lasers performants ultrarapides et des systèmes optiques précis et modulables.

Les lasers utilisés actuellement sont généralement des lasers Titane : Saphir de durée d'impulsion inférieure à 100 fs et dont la longueur d'onde peut varier de 650 et 1100 nm. Afin d'exciter l'échantillon à une longueur d'onde précise, le laser doit être accordable. Ces lasers ont un coût élevé qui représente une large part du coût du microscope. Leur prix varie entre 110000 et 150000 € en moyenne. Les améliorations en perspective dans ce domaine concernent donc principalement la réduction des coûts du laser, par exemple en utilisant pour le pompage une diode laser relativement peu onéreuse comparée aux solutions existantes [Sibbett 12]. Par ailleurs, de nouvelles possibilités d'imagerie en profondeur dans les tissus sont attendues grâce au développement de sources lasers ultra-rapides de longueurs d'onde plus élevées, de l'ordre de $1,5 \mu\text{m}$.

En raison des coûts de l'équipement et du développement récent de la technique, la microscopie bi-photonique est principalement employée dans le secteur de la recherche et n'est pour le moment pas industrialisée. Certaines entreprises l'utilisent cependant, notamment dans le domaine des cosmétiques. A cette échelle, la conception des microscopes est personnalisée et diffère selon l'usage souhaité : types d'objectifs, fenêtres spectrales de détection, positionnement de l'échantillon, séparation du faisceau d'excitation, etc. Le coût moyen d'un microscope biphoton, laser inclus, est de l'ordre de 400000 € mais varie selon les systèmes optiques utilisés.

Au vu des enjeux en biologie et en médecine, la microscopie biphotonique offre un nouveau potentiel en imagerie. Les améliorations technologiques ainsi que l'augmentation de la demande devraient permettre, à terme, de rendre l'équipement plus abordable et de répandre son utilisation.

Dans le cadre des projets Naomi et Namdiatream, l'imagerie est réalisée au GAP-biophotonics (Genève) au moyen d'un système basé sur un microscope inverse Nikon A1R-MultiPhoton, couplé à un oscillateur accordable Mai-Tai Spectra-Physics (100 fs, 80 MHz, 700-1100 nm). Le balayage de l'échantillon est effectué directement par le mouvement du faisceau optique, contrôlé par un système de miroirs, ce qui permet de garder l'échantillon stable durant la manipulation. En détection, le signal est séparé spectralement à l'aide de miroirs dichroïques et de filtres interférentiels, aux longueurs d'onde de $395 \pm 5,5$ nm, 485 ± 10 nm, 531 ± 20 nm, et 607 ± 35 nm. Quatre détecteurs indépendants placés derrière les filtres permettent ainsi l'acquisition en parallèle des signaux sur les différentes gammes de longueurs d'onde et deux filtres additionnels peuvent également être utilisés ponctuellement à 360 ± 6 nm et $434 \pm 8,5$ nm. Par ailleurs, la puissance d'excitation est calibrée de manière à conserver des conditions comparables lorsque l'on modifie la longueur d'onde incidente.

II.2.c Marqueurs : synthèse et fonctionnalisation

L'objectif de cette partie est de présenter les caractéristiques des nanoparticules utilisées comme marqueurs, c'est-à-dire les matériaux et techniques de synthèse associées ainsi que les méthodes de fonctionnalisation nécessaires à une bonne interaction des particules en milieu biologique. Nous nous intéressons ici uniquement à des nanocristaux de structure cristalline non-centrosymétrique, pour lesquels la GSH est inhérente au cristal et n'est pas liée à des effets de surface.

◊ Quantum Dots (QDs)

Les Quantum Dots sont déjà bien connus pour leurs propriétés de fluorescence et leur petite taille de l'ordre de 10 nm. Parmi ceux-ci, certains ont une structure non-centrosymétrique et peuvent également générer un signal de second harmonique.

Ces caractéristiques optiques de GSH ont été étudiées par différents groupes, tenant compte des effets de taille pouvant y être associés. Les matériaux suivants sont recensés : CdSe [Jacobssohn 00], CdS [Zhang 01], CdZnS [Petrov 02] et CdTe [Winter 11].

Cependant, différentes études ont prouvé leur toxicité élevée, liée principalement à la présence de cadmium [Hardman 06, Lewinski 08, Gomes 11]. Cet inconvénient majeur pour des applications biologiques peut entraver leur utilisation *in-vivo*. Les risques pour l'environnement et le recyclage sont aussi à considérer en cas de production industrielle.

◊ Nanoparticules de molécules organiques conjuguées à structure non-centrosymétrique

L'assemblage de molécules organiques par conjugaison permet d'obtenir une amplification de la réponse ONL de ces molécules [Shen 00, Yi 04]. La réalisation de tels assemblages sous forme de nanoparticules peut donc également être envisagée pour des applications de marquage GSH lorsque la structure est de type non-centrosymétrique. Le développement de techniques de synthèse a permis d'obtenir ce type de nanoparticules organiques sous diverses formes. Des nanocristaux (de CMONS) dispersés en matrice sol-gel ont ainsi été étudiés pour leurs propriétés GSH et ont montré un potentiel intéressant en tant qu'alternative aux sondes fluorescentes moléculaires [Treussart 03]. Plus récemment, des systèmes hybrides constitués de chromophores (DAZOP) intercalés avec des couches inorganiques (de type MPS_3) ont été étudiés en matrice polymère par microscopie de GSH [Delahaye 09]. La réponse GSH particulièrement élevée d'agrégats de 100-300 nm formés de nanocristaux individuels de l'ordre de 10 nm a ainsi été estimée, ce qui présente une perspective intéressante pour les applications biomédicales. Des améliorations en ce qui concerne les techniques de synthèse sont encore nécessaires afin d'obtenir de tels agrégats dilués en solution et non sous forme de nanocristaux individuels pour lesquels la réponse est plus faible.

◊ Matériaux inorganiques non-centrosymétriques et techniques de synthèse

D'autres matériaux présentant cette structure non-centrosymétrique peuvent être utilisés comme marqueurs GSH. Il s'agit de matériaux inorganiques, principalement des oxydes, parmi lesquels on trouve : ZnO , $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$, KNbO_3 , LiNbO_3 , KTiOPO_4 (plus connu sous le nom de KTP), BaTiO_3 et SiC , étudiés durant ce travail.

Différentes techniques de synthèse sont utilisées actuellement pour obtenir des cristaux de taille nanométrique.

- La voie sol-gel est généralement employée pour l'élaboration de cristaux de BaTiO_3 [Rodriguez 09], et de ZnO [Kachynski 08].
- La synthèse hydrothermale est également appropriée pour le ZnO [Baruah 09]. Des cristaux de niobate de potassium ont aussi été obtenus grâce à cette technique, le plus souvent sous forme de nanofils [Nakayama 07, Dutto 11].
- La synthèse solvothermale a été utilisée pour la fabrication de cristaux de LiNbO_3 de taille $< 50\text{nm}$ [Mohanty 12].
- Une autre technique pour le LiNbO_3 consiste à réduire des sels de niobium puis à les hydrolyser avec LiH [Aufrey 09].
- Des nanocristaux de KTP ont été récupérés par centrifugation de poudres brutes issues des restes de cristallisation des cristaux massifs [Le Xuan 08].
- La synthèse par co-précipitation en microémulsions, employée par [Mugnier 11], a été utilisée pour élaborer des aiguilles de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$.
- Le broyage de macro cristaux est également une technique permettant d'obtenir des nanocristaux. Elle peut être mécanique ou de type électro-chimique comme la technique "arc-vapor" utilisée par [Urban 12]. Cependant, les méthodes de broyage génèrent des distributions de taille et de forme très larges, entraînant une perte importante de matériau.

Les tailles et formes obtenues dépendent de la technique de synthèse utilisée mais également de nombreux paramètres inhérents à ces techniques. Actuellement, l'obtention de nanocristaux de 100 nm n'est plus problématique. Il est cependant encore difficile d'atteindre des tailles inférieures à 50 nm , si l'on souhaite une internalisation cellulaire efficace. D'autre part, le contrôle de la forme des nanoparticules, de leur qualité cristalline et de la reproductibilité et du rendement des procédés est un défi qui reste d'actualité. L'amélioration des techniques de synthèse des nanocristaux est donc un enjeu important pour les applications visées puisque la quantification de propriétés physico-chimiques et de toxicité dépend directement de ces distributions.

◇ Biocompatibilité et fonctionnalisation

La biocompatibilité d'un marqueur suppose en premier lieu une faible toxicité. Au-delà des effets de toxicité du matériau même, que nous aborderons plus loin, il faut également réduire au maximum les effets d'agrégation. Pour cela, un traitement de surface ou une encapsulation est généralement mis en œuvre afin de stabiliser les nanoparticules sous forme de suspensions colloïdales.

L'encapsulation a aussi pour intérêt de rendre les particules invisibles pour le système immunitaire. Cela évite l'élimination trop rapide des marqueurs, leur accumulation au niveau du système immunitaire et permet une plus longue circulation dans le flux sanguin par exemple. Le Polyéthylène glycol (PEG) est un polymère généralement utilisé pour sa biocompatibilité.

Lorsque l'effet recherché consiste à internaliser les marqueurs dans les cellules, il a été démontré [Yu 11, Serdiuk 12] que la charge surfacique des marqueurs avait une forte influence. Des traitements de surface spécifiques sont alors employés pour modifier la charge surfacique initiale. L'encapsulation permet également de modifier la charge de surface.

Dans certains cas, l'objectif est de réaliser un marquage spécifique. Le marquage spécifique consiste à cibler certaines molécules, en général des protéines. Cela permet le marquage de récepteurs membranaires exprimés spécifiquement (ou en surexpression) à la surface de certaines cellules. Par exemple, les cellules cancéreuses qui expriment très fortement les récepteurs aux facteurs de croissance peuvent ainsi être détectées par cette technique. Pour cela, il faut fonctionnaliser les particules. La fonctionnalisation s'effectue en deux étapes principales. Tout d'abord l'encapsulation qui a pour but de protéger la particule et de rattacher des groupements fonctionnels à sa surface, par exemple des groupements amine. Ensuite la bioconjugaison consiste à rattacher des molécules de ciblage ou des anticorps à ces groupements fonctionnels.

Les techniques d'encapsulation sont variées et souvent issues de celles utilisées pour les QDs. Diverses publications résument [Medintz 05] ou décrivent plus précisément les stratégies utilisées [Basiruddin 10]. Les nanoparticules GSH utilisées étant pour la plupart des oxydes, la silanisation, décrite dans la figure 1.14, est la méthode la plus facile à mettre en œuvre et la plus courante. Le couche de silane résultante de cette encapsulation peut ensuite être enrobée par du PEG. Il est également possible d'utiliser directement

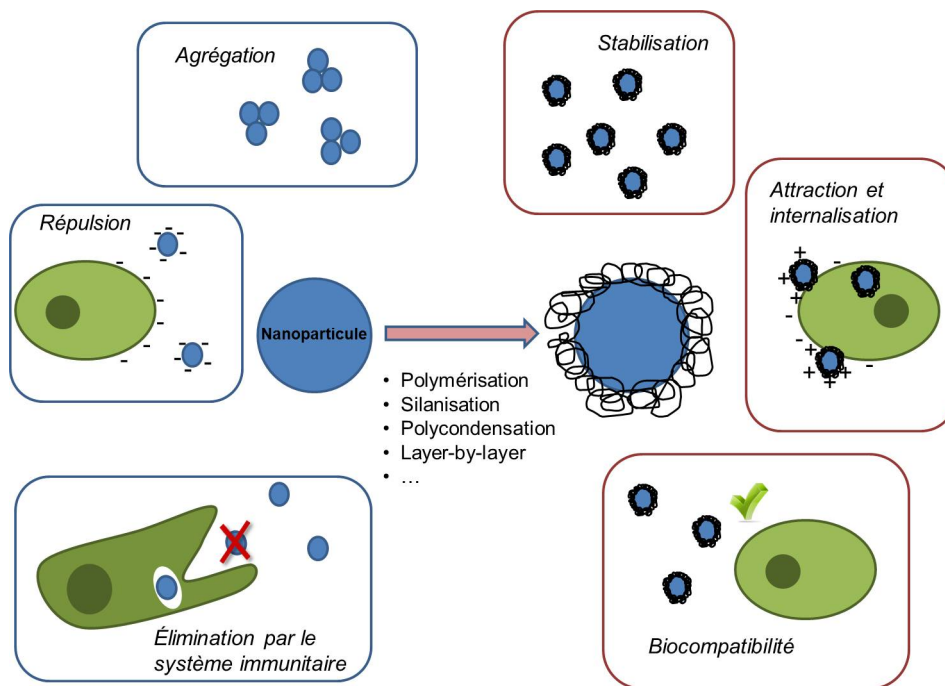


Figure 1.12 – Intérêts de l'encapsulation des nanoparticules en milieu biologique.

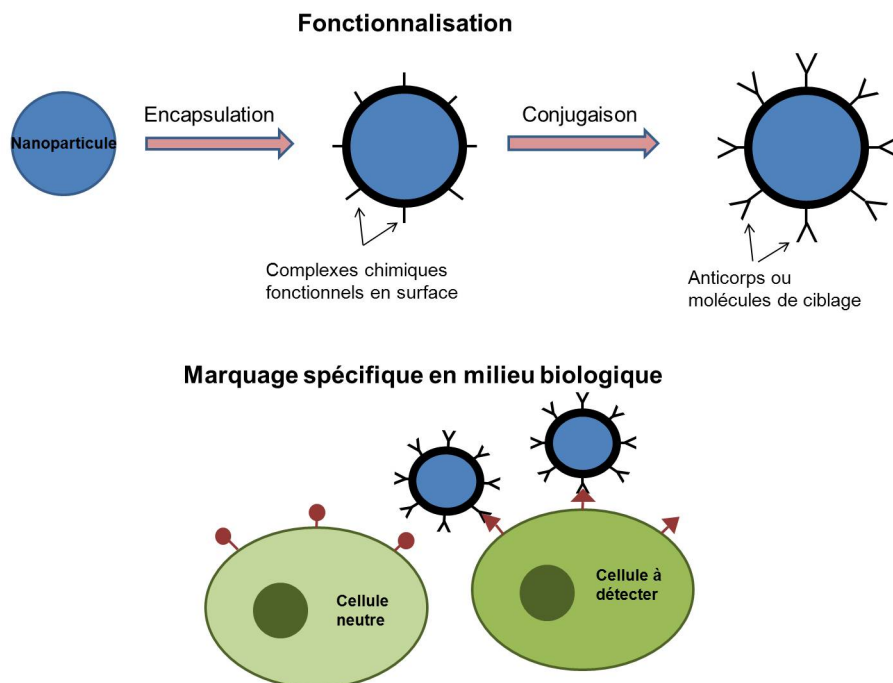


Figure 1.13 – Fonctionnalisation et marquage spécifique.

des polymères ou des phospholipides qui sont reliés à des fonctions chimiques. Une encapsulation de ce type peut se faire par liaison covalente ou par simple interaction électrostatique.

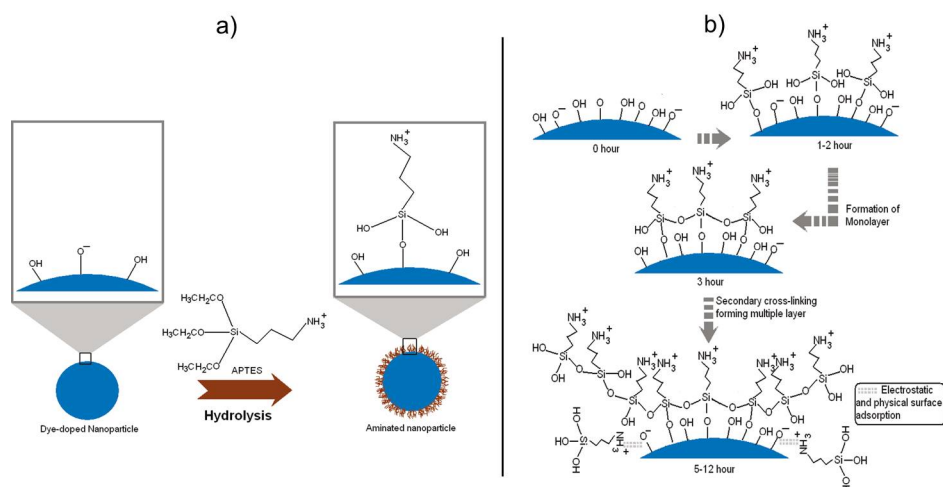


Figure 1.14 – (a) Principe de la silanisation et (b) schéma décrivant le dépôt d'APTES en fonction du temps. *Extrait de [Roy 10].*

La bioconjugaison peut employer deux voies. La première consiste à utiliser des anticorps, qui sont des protéines de grande taille (environ 20-30 nm) naturellement produites par les organismes vivants de manière à s'attacher spécifiquement à des protéines. L'utilisation artificielle de ces anticorps nécessite souvent une production préalable effectuée dans des bioréacteurs ou à partir d'animaux. La greffe d'anticorps sur les nanoparticules est effectuée par des liens peptidiques. Il existe aussi des anticorps secondaires qui peuvent se rattacher à des anticorps premiers et qui eux-mêmes vont fixer une protéine cible. Cet enchaînement est parfois utile dans les méthodes de marquage spécifique et pour des procédures de contrôle négatif.

La seconde méthode emploie des inhibiteurs synthétisés artificiellement. Ces molécules sont souvent issues de médicaments et leur utilisation est plus délicate car elle nécessite de développer la copie des molécules existantes, les méthodes de fixation pour les accrocher aux particules et éventuellement la modification de ces molécules pour améliorer leur performance.

Enfin, lorsque les particules doivent être utilisées pour différentes applications, un marquage multifonctionnel doit être envisagé, regroupant plusieurs techniques de fonctionnalisation sur un même nano-objet [McCarthy 12].

► Quelques exemples

La stabilisation de particules de ZnO a été réalisée par [Kachynski 08] à l'aide de micelles phospholipidiques. Dans cette expérience, une partie de ces phospholipides est préalablement conjuguée à des molécules d'acide folique afin de cibler des cellules tumorales. Les particules de ZnO bioconjuguées avec l'acide folique présentent une internalisation des cellules beaucoup plus élevée.

Un autre travail [Hsieh 09] présente une technique de stabilisation de particules de BaTiO_3 . Après un traitement de surface à l'acide phosphorique, les particules sont enrobées par des groupements amine. La stabilisation de la suspension est alors assurée par répulsion électrostatique entre groupements NH_3^+ .

Le même groupe a aussi développé une méthode détaillée de bioconjugaison de particules de BaTiO_3 [Hsieh 10b] (fig. 1.15), incluant un traitement de surface par de l'acide nitrique pour une formation de liaisons covalentes avec des couches organiques grâce à l'emploi d'APTES. La bioconjugaison d'anticorps secondaires est enfin réalisée par la réaction catalysée entre les groupements amine déjà présents et les sulfhydryls rattachés préalablement aux anticorps. La spécificité du marquage a par la suite été testée au moyen de contrôles négatifs.

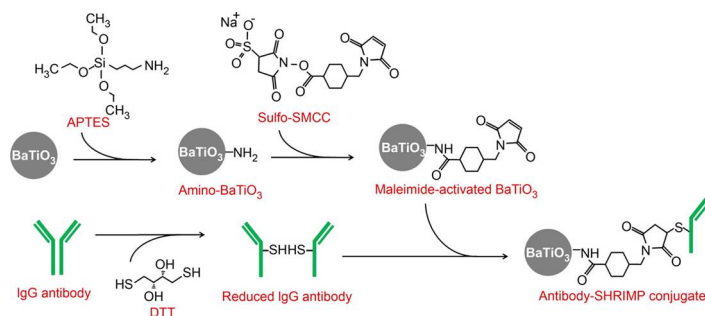


Figure 1.15 – Principe de bioconjugaison de BaTiO₃ par anticorps immunoglobuline G. *Extrait de [Hsieh 10b].*

Le groupe de Pantazis a également travaillé sur la fonctionnalisation du BaTiO₃. Dans un premier travail [Pantazis 10], les nanoparticules sont conjuguées à des anticorps secondaires marqués préalablement par des cyanines fluorescentes Cy5. Une autre publication [Čulić Viskota 12] détaille précisément le protocole mis en place afin de fonctionnaliser ces particules avec de la biotine, après une encapsulation par du PEG et des méthodes de chimie click.

Dans le projet Namdiatream, la fonctionnalisation comprend une encapsulation par silanisation puis un enrobage PEG. La présence en surface de groupements azide permet alors de conjuguer par chimie click les nanoparticules à des peptides antagonistes RGD. Ces derniers iront ensuite se fixer sur des protéines intégrine $\alpha V\beta 3$. Alternativement, des inhibiteurs tels que l'erlotinib et la lapatinib sont également utilisés comme molécules de ciblage. Ces molécules vont se fixer sur des récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGFR ou le HER2, qui sont principalement présents sur les cellules cancéreuses.

II.2.d Applications des marqueurs GSH pour l'imagerie biologique

Après avoir cité les intérêts des marqueurs pour l'imagerie biologique de manière synthétique au paragraphe II.2.a, nous allons maintenant présenter de manière plus détaillée les différents travaux effectués dans ce contexte. Avant de présenter les résultats obtenus en imagerie, nous nous intéressons dans un premier temps à la problématique de la toxicité qui est un critère décisif pour l'étude des milieux biologiques.

◇ Toxicité

▷ Qu'est-ce que la toxicité ?

Lorsque l'on travaille avec des milieux biologiques vivants, il est nécessaire de s'assurer que les études effectuées n'endommagent pas ces milieux. Dans le cas de l'utilisation de marqueurs GSH, leur impact peut être observé à différents niveaux. La destruction directe des cellules est le phénomène le plus évident à observer. Mais il faut également prendre en compte le potentiel d'altération du fonctionnement cellulaire, ainsi que la modification des dynamiques de prolifération cellulaire et de différenciation de cellules souches.

De plus, les causes de toxicité peuvent être variées. Elles peuvent provenir de la composition chimique, à savoir si le constituant est stable et neutre chimiquement, ce qui dépend évidemment de l'environnement biologique dans lequel il se trouve. La toxicité peut également être liée à la composition chimique de surface des particules uniquement, ce qui nécessite une attention particulière aux procédures de fonctionnalisation des marqueurs. La stabilité des particules en suspension joue un rôle important puisqu'un matériau chimiquement inerte peut devenir toxique par simple accumulation ou agrégation. Pour finir, la forme des nano-objets peut également jouer un rôle en toxicité.

▷ Toxicité des nanoparticules GSH

Différentes études ont mis en avant la faible toxicité de certains marqueurs GSH inorganiques. En ce qui concerne le BaTiO₃, [Pantazis 10] montre le développement normal d'un embryon de poisson-zèbre dont les cellules sont marquées par des nanoparticules de BaTiO₃. Des études biologiques plus approfondies me-

nées par Ciofani et al. déterminent la toxicité de ces particules sur les cellules. Différents paramètres sont évalués, qu'ils soient quantitatifs, comme l'étude du métabolisme (transformations énergétiques dans la cellule) ou de la prolifération cellulaire, ou qualitatifs, tels l'apoptose (mort cellulaire auto-programmée), la viabilité et la différenciation. Deux conclusions peuvent être tirées de ces travaux : la faible toxicité des nanoparticules de BaTiO_3 d'une part, et l'importance de l'encapsulation de ces particules d'autre part. En effet, dans une première étude [Ciofani 10], les particules enrobées de polylysine semblent toxiques après 24h pour des concentrations supérieures à $10 \mu\text{g/mL}$. Une seconde étude [Ciofani 13] basée sur les mêmes particules mais enrobées par du glycol-chitosan, montre quant à elle des effets de toxicité à des concentrations bien plus élevées, de 50 à $100 \mu\text{g/mL}$ et après 120h. Dans l'ensemble, le BaTiO_3 présente donc une faible toxicité et les polymères utilisés pour l'enrobage doivent être précautionneusement choisis.

Le ZnO , contrairement au BaTiO_3 , semble présenter une toxicité plus importante. L'une des nombreuses études menées à ce sujet [Xia 08] met en évidence la libération de dérivés réactifs de l'oxygène lors de l'exposition de cellules à du ZnO , entraînant une dégradation cellulaire importante sur les deux types de cellules utilisés. L'hypothèse proposée permettant d'expliquer ce phénomène serait que les particules de ZnO se dissolvent dans les milieux de cultures.

Une étude comparative de différents matériaux [Staedler 12] confirme la toxicité du ZnO sur des cellules. Comme on le voit sur la figure 1.16, la forme arrondie des cellules exposées aux nanocristaux de ZnO indique un mauvais état de santé, tandis que les autres cellules semblent peu affectées. L'absence de marqueurs GSH (en bleu) semble confirmer l'hypothèse selon laquelle il y a dissolution du ZnO .

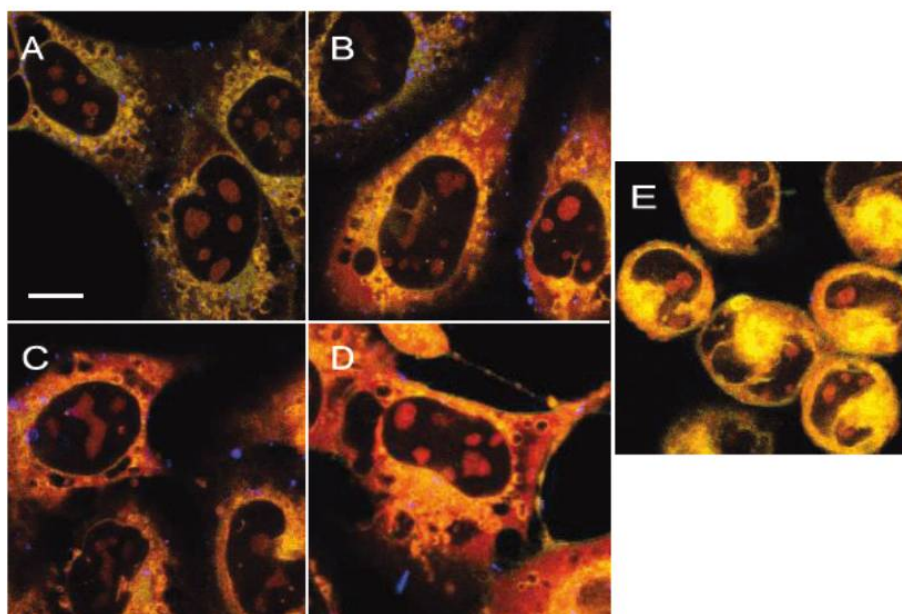


Figure 1.16 – Cultures de cellules BEAS-2B exposées pendant 5h à des nanocristaux de (A) BaTiO_3 , (B) KNbO_3 , (C) LiNbO_3 , (D) KTP , et (E) ZnO . Extrait de [Staedler 12].

En parallèle, cette même étude évalue la toxicité de ces particules par des tests de cytotoxicité et d'hémolyse, et ce sur trois types de cellules tumorales du poumon. Les particules sont stabilisées avec du Poly-Ethylene Glycol (PEG) et des concentrations de $50 \mu\text{g/mL}$ sont utilisées pour ces tests.

- Le contrôle de cytotoxicité par test MTT, consiste à déterminer la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement par rapport au nombre de cellules totales. Une faible diminution est observée pour BaTiO_3 , KNbO_3 et LiNbO_3 après 24h, et l'on note une diminution de 20 à 30% après 72h. Les cristaux de KTP entraînent une cytotoxicité plus importante avec le temps alors que les cristaux de ZnO sont nettement cytotoxiques.
- Le test d'hémolyse consiste à observer la destruction des globules rouges en présence des nanocristaux. Si la destruction de ces cellules est un phénomène naturel entraînant la libération

d'hémoglobine (Hb) dans le plasma sanguin, elle peut occasionner de sévères troubles lorsqu'elle est accélérée. Cette accélération artificielle peut être provoquée par exemple par des interactions électrostatiques entre les membranes cellulaires et les particules, ou encore par la formation de dérivés réactifs de l'oxygène. C'est donc un indicateur intéressant pour des applications *in vivo*. Les résultats montrent un taux d'hémolyse de 4,6 à 7% avec des particules de BaTiO_3 , KNbO_3 et LiNbO_3 . L'enrobage des particules joue également un rôle très important dans ce cadre.

◊ Détection en profondeur

Pouvoir détecter des marqueurs en profondeur dans un tissu est un avantage considérable de la GSH pour les applications bio-médicales. Nous avons énoncé précédemment que la flexibilité en longueur d'onde des sondes GSH permet de travailler dans des zones spectrales où les milieux biologiques absorbent peu. En pratique, différents paramètres sont à prendre en compte pour une imagerie en profondeur :

- L'intensité de GSH des sondes
- L'absorption des tissus
- La diffusion des tissus
- L'anisotropie des tissus et la configuration géométrique.

L'intensité des sondes GSH joue un rôle dans la mesure où un signal de GSH intense sera moins facilement absorbé par un tissu qu'un signal faible. L'intensité du signal dépend non seulement de l'intensité d'excitation mais également du matériau et de la taille des marqueurs. En effet, l'intensité de GSH est proportionnelle au carré du volume du cristal. L'étude de [Grange 11] montre effectivement qu'il sera plus facile de détecter en profondeur des cristaux de grande taille (300 nm) que de petite taille (100 nm) (fig. 1.17). Pour les mêmes raisons, le contraste par rapport à de la GSH endogène est également meilleur lorsque la taille augmente. Cependant, il est important de rappeler que la taille des cristaux ne doit pas être trop grande pour certaines applications biologiques et qu'un compromis doit alors être trouvé.

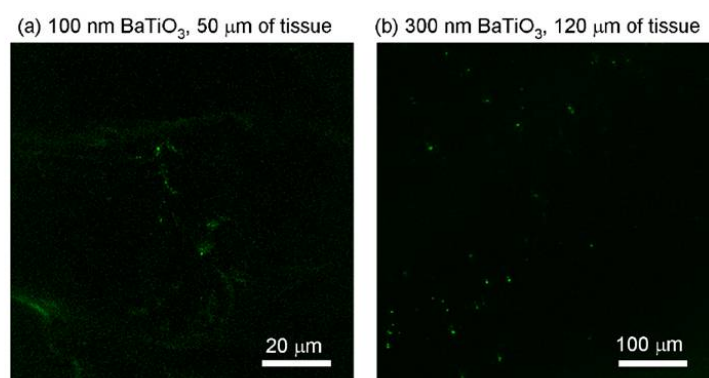


Figure 1.17 – Imagerie en profondeur : (a) cristaux de 100 nm sous une épaisseur de tissu de 50 μm de queue de souris, (b) cristaux de 300 nm sous une épaisseur de tissu de 120 μm . *Extrait de [Grange 11].*

La diffusion des tissus est aussi un paramètre important en microscopie. En effet, lorsque le laser est focalisé dans un milieu diffusant, les photons sont déviés de leur trajectoire initiale. Cela réduit l'efficacité d'excitation, puisqu'il est alors plus difficile de réunir les conditions selon lesquelles deux photons doivent se trouver au même endroit en même temps. La déviation des photons de second harmonique réduit également la probabilité de détection du signal de GSH.

L'impact de ces effets en détection profonde a été simulé et expérimenté par [Extermann 09]. Sur la figure 1.18, on observe la décroissance exponentielle du signal de GSH en fonction de l'épaisseur de tissu traversé. Il est intéressant de noter que le modèle prend en compte les propriétés d'absorption et de diffusion des tissus et que les marqueurs situés en profondeur sont plus aisément détectés pour des longueurs d'onde d'excitation élevées, dans l'IR (1550 nm ici). Cette observation permet de conclure que la diffusion joue un rôle plus important que l'absorption à ces longueurs d'onde. Malgré une plus forte absorption à 1550 nm par rapport à la fenêtre de transmission biologique (700-1000 nm), il est quand

même plus intéressant de travailler à des longueurs d'onde élevées pour détecter la GSH en profondeur dans les tissus. L'étude de [Balu 09] confirme ces observations.

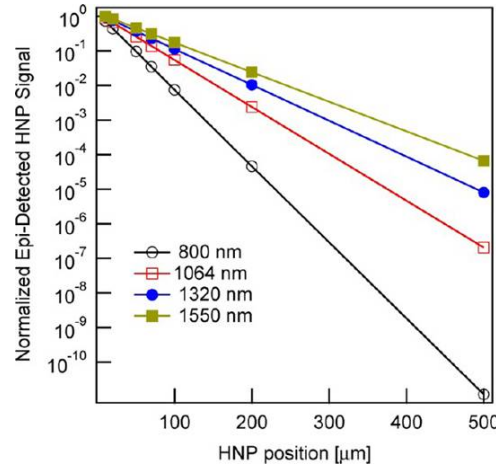


Figure 1.18 – Intensité de détection du signal GSH en fonction de la profondeur des nanocristaux, pour différentes longueurs d'onde. *Extrait de [Extermann 09].*

L'anisotropie des tissus est également prise en compte dans ce type d'étude et mise en relation avec la configuration géométrique. Il est intéressant de noter à ce sujet que la GSH issue de marqueurs nanométriques est émise de manière isotrope, selon le modèle de diffusion de Rayleigh. Cela permet de détecter le signal de manière trans- ou épi-directionnelle au choix.

Dans ce contexte d'imagerie en milieu complexe, un dernier travail propose l'utilisation des propriétés de cohérence de la GSH afin de détecter des marqueurs à travers une couche turbide [Hsieh 10a]. Cette méthode ne permet pas d'imager en profondeur car elle est utilisable uniquement dans le cas de milieux turbides relativement minces. Cependant, elle pourrait être appliquée à des cibles placées dans des milieux non diffusants mais entourés par des couches turbides, comme par exemple pour des crustacés, des œufs ou des vaisseaux sanguins.

♦ Imagerie *in vitro*

Des expériences de marquage spécifique *in vitro* ont été menées par le groupe de Psaltis [Hsieh 10a]. La bioconjugaison de nanocristaux de BaTiO_3 , déjà abordée (voir fig. 1.15), a effectivement permis de détecter spécifiquement des cellules présentant des antigènes de leucocytes humains de classe I (HLA, Human Leucocyte Antigen) à leur surface. La lignée cellulaire utilisée, de type HeLa (cellules cancéreuses), a été tout d'abord marquée par des anticorps premiers, avant d'être détectée par les marqueurs (fig. 1.19 (a)) tandis qu'un échantillon de contrôle, non marqué par ces anticorps premiers n'a pas été détecté (fig. 1.19 (b)).

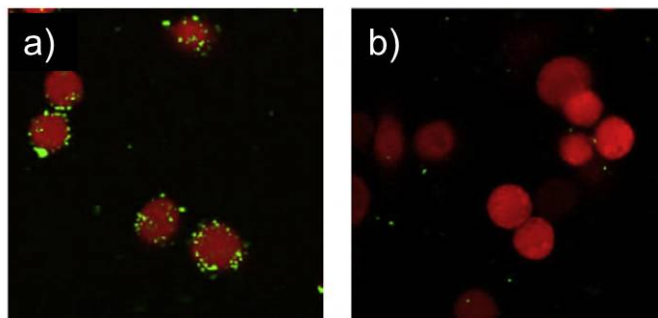


Figure 1.19 – Fusion d’images GSH (vert) et de fluorescence (rouge) de cellules HeLa mise en contact avec des marqueurs GSH spécifiques : (a) avec un marquage préalable par anticorps premiers, (b) sans marquage préalable. *Extrait de [Hsieh 10a]*.

Le même groupe a travaillé sur de la détection en profondeur *in vitro* [Grange 11], dont les résultats ont déjà été présentés sur la figure 1.17.

Dans notre projet, un marquage non spécifique a été expérimenté sur des cellules de cancer du poumon HTB-182 et des cellules saines BEAS-2B [Staedler 12]. Le marquage est effectué dans ce cas par des nanocristaux simplement stabilisés par enrobage avec du PEG. Ces particules stabilisées viennent ensuite s’accrocher à la surface des cellules lors d’une mise en contact de quelques heures puis les marqueurs non accrochés sont enfin retirés par lavage. Les cellules cancéreuses HTB-182 ainsi marquées par du KNbO_3 sont présentées sur la figure 1.10. Les images des cellules BEAS-2B marquées par de nombreux types de cristaux, sont illustrées par la figure 1.16.

Une autre expérience menée dans le même cadre, consiste à utiliser ces marqueurs pour suivre la différenciation de cellules souches embryonnaires de souris [Magouroux 12]. Mises en culture et exposées à des marqueurs selon deux méthodes différentes, ces cellules se sont, dans les deux cas, différenciées en cellules cardiaques d’une part et rosettes neuronales d’autre part. Aucune modification de développement n’a été observée entre des cultures marquées et les cultures non exposées aux nanoparticules. De plus, l’acquisition du mouvement des marqueurs GSH a permis d’observer les battements cardiaques des cellules différenciées, comme le montre la figure 1.20.

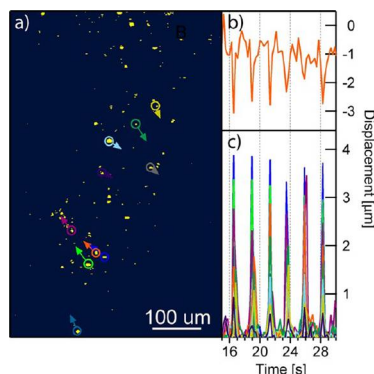


Figure 1.20 – (a) Image de marqueurs GSH sur des cellules souches différenciées. Les flèches indiquent le déplacement des marqueurs entraînés par les contractions de cellules cardiaques. Ces déplacements sont enregistrés en fonction du temps (b) hors du plan et (c) dans le plan de l’échantillon. *Extrait de [Magouroux 12]*.

Un dernier groupe [Urban 12] a réalisé de l’imagerie GSH *in vitro* à partir de sang de poisson-zèbre (zebrafish). Dans ce cas, des nanocristaux de ZnO ont été injectés dans le sang puis des lamelles de sang ont été observées au microscope après 30 min. L’internalisation des marqueurs par les thrombocytes (ou plaquettes) est visible sur la figure 1.21. Aucune trace de ZnO n’ayant été vue dans le muscosquelette,

l'internalisation des marqueurs semble spécifique aux thrombocytes ce qui est probablement lié à la similarité des charges de surface de ZnO et de celles des corpuscules du sang.

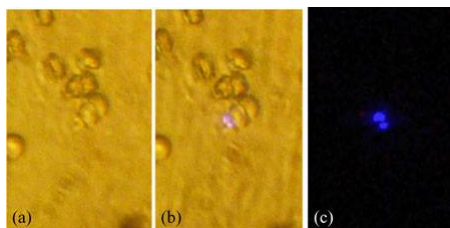


Figure 1.21 – Marquage GSH de thrombocytes : (a) échantillon de sang en lumière blanche, (b) en lumière blanche et détection GSH et (c) GSH uniquement. *Extrait de [Urban 12].*

Pour finir, une technique d'imagerie un peu particulière est proposée par [Hsieh 09]. Basée sur la propriété de cohérence de la réponse GSH, elle permet de réaliser de l'imagerie holographique en trois dimensions. Cette technique a été appliquée avec succès à des marqueurs GSH internalisés dans des cellules.

◇ Imagerie *in vivo*

Une des premières études de marquage GSH *in vivo* a été menée par [Pantazis 10]. Des particules de BaTiO₃ ont été injectées dans un embryon de poisson-zèbre au stade unicellulaire. L'imagerie de GSH a été réalisée après 72 heures de développement embryonnaire et les marqueurs sont observés à travers tout le corps du poisson-zèbre. De plus, la présence des nanoparticules de BaTiO₃ ne semble pas avoir perturbé le développement normal de l'embryon. Un test de marquage spécifique a permis, en parallèle, de localiser la présence de la protéine dystrophine dans l'embryon après 24 heures de développement. Le contraste obtenu est bien meilleur que pour des tests similaires en fluorescence, comme montré dans la figure 1.22. La comparaison de deux types d'imagerie est effectuée sur un même échantillon au moyen de sondes multifonctionnelles, la Cy-5 pour la fluorescence et BaTiO₃ pour la GSH.

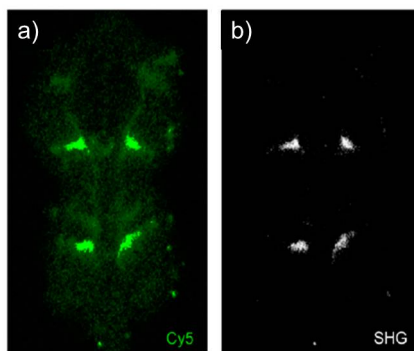


Figure 1.22 – Localisation *in vivo* de la dystrophine dans un embryon de poisson-zèbre (a) par fluorescence et (b) par GSH. *Extrait de [Pantazis 10].*

Du marquage GSH a également été réalisé sur des cellules végétales, lors de la croissance de plantes [Urban 12]. La procédure employée est la suivante : des graines d'*A. thaliana* sont mises en culture en présence de nanocristaux de ZnO. L'internalisation est observée après trois jours de germination comme montré figure 1.23. La présence de GSH dans une pousse issue de ces graines atteste de la diffusion des marqueurs lors de la croissance (fig. 1.23 (c)).



Figure 1.23 – Marquage GSH de cellules végétales *A. thaliana*. (a) et (b) Marqueurs GSH présents dans les germes. (c) Marqueurs dans une pousse. *Extrait de [Urban 12]*.

Pour finir, les travaux de détection en profondeur de [Grange 11] que nous avons déjà mentionnés, font état d'imagerie *in vivo* également. L'expérience a consisté en une injection de cristaux de BaTiO_3 dans une queue de souris dont le système expérimental et les résultats sont présentés figure 1.24. Des sondes GSH ont pu être détectées à 100 μm de profondeur dans ce contexte, sans risque de confusion avec de la GSH endogène.

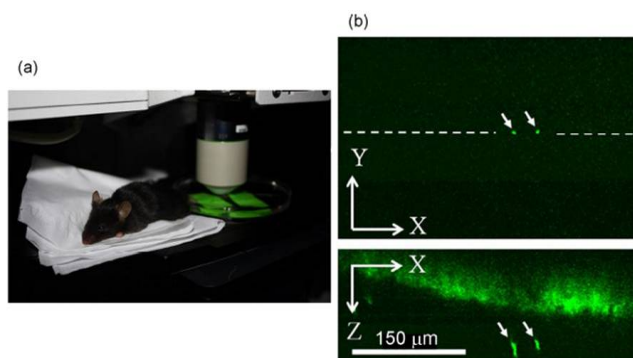


Figure 1.24 – Marquage GSH *in vivo* : (a) système expérimental (la souris est endormie) et (b) imagerie GSH dans une queue de souris dans les deux plans (XY) et (XZ). *Extrait de [Grange 11]*.

Conclusion

L'utilisation récente des marqueurs GSH pour les applications bio-médicales offre de nouvelles perspectives en imagerie, grâce à la combinaison de leurs propriétés optiques et de leur faible toxicité. Des observations *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* ont pu être réalisées, parfois à travers des tissus épais et troubles. Ces expériences laissent présager de l'utilité de ces sondes pour de nouvelles avancées en biologie et en médecine, grâce à des études portant par exemple sur le développement de l'embryon, la différenciation de cellules souches, la détection de cellules cancéreuses ou encore l'expression du système immunitaire sur des cellules cancéreuses. Cependant, de nombreux progrès sont encore à réaliser. Citons en particulier la synthèse de petites particules de taille et de forme maîtrisées et de structure cristalline adéquate, le développement des méthodes de fonctionnalisation et la quantification des réponses ONL des nanocristaux qui restent des enjeux importants pour l'essor de cette technique.

II.3 Alternatives

Si des avancées en terme de marquage biologique et d'imagerie bio-médicale reposent sur le développement de marqueurs optiques tels que les nanoparticules GSH, nous présentons ici brièvement d'autres types de sondes pour des approches complémentaires et alternatives.

II.3.a Nanodiamants fluorescents

Parmi leurs nombreuses caractéristiques, les particules de diamant sont relativement faciles à produire à taille nanométrique, sont inertes chimiquement et leur surface est relativement aisée à fonctionnaliser. Cela permet d'envisager de nombreuses applications médicales comme agents thérapeutiques, aide au diagnostic ou utilisation pour de l'analyse biologique [Schrand 09].

Les nanodiamants sont particulièrement intéressants en imagerie bio-médicale pour leurs propriétés optiques. En plus de leur transparence et de leur indice de réfraction élevé, ces nanoparticules sont photoluminescentes. Cette photo-luminescence est liée à la présence d'impuretés, c'est-à-dire d'atomes étrangers dans la structure du cristal, entraînant la création de bandes d'absorption et d'émission.

De nombreux centres colorés de ce type sont recensés et parmi eux, les centres de type azote-lacune (NV, pour nitrogen-vacancy). Ces centres sont généralement créés par irradiation de particules (électrons, protons, ions hélium) sur les nanocristaux (entraînant la formation de lacunes) et après un recuit à 600-800 ° C, permettant la migration de ces lacunes vers les atomes substitutionnels d'azote. Deux types de centres NV existent, les centres neutres NV⁰ et les centres chargés négativement NV⁻, de raie zéro-phonon à 575 nm et 637 nm respectivement. Ces longueurs d'onde, en particulier pour les centres NV⁻, s'approchent de la fenêtre de transparence des tissus biologiques. L'efficacité quantique de ces nanodiamants est très élevée, proche de 1, et la durée de vie de fluorescence est relativement longue, entre 10 et 40 ns. Pour finir, le signal de fluorescence est très stable puisqu'il semble n'y avoir ni photo-dégradation avec le temps ni clignotement contrairement aux effets observés avec les QDs actuels.

De plus, les nanodiamants sont faiblement toxiques. Une première expérience *in vitro* montre l'internalisation spontanée de nanoparticules par des cellules HeLa ainsi que la faible cytotoxicité apparente de ces particules [Yu 05]. Un autre groupe présente des travaux montrant également la faible toxicité de ces particules sur des vers *Caenorhabditis elegans* [Mohan 10]. Plus récemment, il a été démontré que ces sondes sont biocompatibles avec des cellules et des micro-organismes et que ces marqueurs optiques peuvent être utilisés pour une imagerie *in vivo* de ces micro-organismes [Lin 12].

D'autres travaux portent sur l'imagerie biologique grâce à ces sondes nanodiamants. En particulier, l'utilisation de la microscopie biphotonique a permis d'améliorer le contraste par rapport à de la fluorescence endogène [Chang 08], grâce notamment à une meilleure absorption des centres neutres. Cela implique malheureusement le décalage du spectre d'émission dans le bleu mais la photostabilité du signal est conservée. Un autre effet secondaire de l'utilisation de la microscopie biphotonique est la transformation de centres NV⁻ en centres neutres en raison de l'ionisation des premiers par excitation laser femto-seconde.

Ces types de marqueurs présentent ainsi des perspectives intéressantes. Dans ce cadre, certains articles passent en revue les techniques de synthèse et de transformation de surface de ces particules [Mochalin 12], tandis que leur utilisation en imagerie est examinée dans les travaux de [Faklaris 09] et de [Hui 10].

II.3.b Upconversion

Parmi les nanoparticules dopées aux ions lanthanides que nous avons déjà évoquées parmi les marqueurs luminescents, certaines présentent cette propriété particulière d'absorber des photons d'énergie inférieure à l'énergie ensuite réémise. Les phénomènes optiques mis en jeu sont différents de la fluorescence à deux photons puisqu'il ne s'agit pas d'une absorption simultanée mais d'une absorption successive de photons.

Les ions Ln³⁺ possèdent une couche électronique 4f incomplète au sein de laquelle les transitions internes, normalement interdites, deviennent permises par la présence d'un environnement spécifique, par exemple la structure cristalline de la matrice hôte. Ces transitions sont intéressantes en imagerie car elles constituent des bandes d'absorption et d'émission étroite ainsi qu'une durée de vie des états excités relativement longue. Cette longue durée de vie favorise l'absorption successive de photons par un ion. Ce phénomène d'excitation successive peut être aussi provoqué par transfert non radiatif de l'énergie d'un ion excité à un autre ion également excité. Les ions lanthanides utilisés dans les phénomènes d'upconversion sont les ions Yb³⁺ associés aux ions Er³⁺ ou Tm³⁺.

Ce phénomène permet donc, à l'instar de la fluorescence à deux photons ou de la GSH, d'exciter une particule à des longueurs d'onde relativement élevées, par exemple en IR, et de détecter un signal

à une longueur d'onde plus faible, avec un décalage de Stokes très important. Cela n'est pas considéré comme un phénomène optique non linéaire à proprement parler puisque sa réponse ne dépend pas du $\chi^{(2)}$. L'excitation ici ne nécessite pas de puissances lumineuses aussi élevées qu'en imagerie multiphotonique et un laser continu suffit pour observer le phénomène sans endommager les tissus. Cela laisse place à la possibilité de faire de l'imagerie en profondeur assez facilement et avec un contraste élevé. La longue durée de vie de fluorescence permet également d'utiliser des techniques de fluorescence retardée afin de filtrer encore mieux la fluorescence endogène.

La synthèse de ces particules reste un enjeu majeur pour une détection efficace [Mialon 10, Haase 11]. La qualité cristalline de la matrice hôte est importante pour diminuer les désexcitations non radiatives par vibration de phonons ou par présence de pièges. Les fluorides (LaF_3 , NaYF_4) sont souvent utilisées pour ces raisons. D'autres types de matrices comme les oxydes (Y_2O_3 , $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}$, YVO_4 , $\text{La}_4\text{Mo}_7\text{O}_{27}$) peuvent également être utilisées pour leur propriétés d'absorption lumineuse, servant alors de sensibilisateur. La taille trop petite des particules (< 20 nm) limite également les performances en raison de phénomènes de désexcitation en surface ou quenching. De plus, la concentration en ions ainsi que leur répartition doit être précisément contrôlée, car au-delà d'un seuil de concentration, l'émission diminue. Par ailleurs, la fonctionnalisation de ces nanoparticules est assez semblable à celle utilisée pour les marqueurs GSH, principalement quand la matrice hôte est un oxyde et n'a pas d'effet notoire sur l'efficacité d'émission lorsque les particules sont suffisamment grandes.

Aucun effet de toxicité n'a pour l'instant été observé sur les milieux biologiques [Nyk 08]. Différentes expériences ont été réalisées avec succès en imagerie biologique. Une liste non exhaustive inclut la détection de particules *in vivo* dans des vers de type *Caenorhabditis Elegans* [Lim 06] ou dans des souris [Chatterjee 08], la détection de cellules souches après transplantation dans une souris [Idris 09], la détection de ganglions lymphatiques (cellules du système immunitaire) dans des souris [Liu 12] ou des études d'interaction de l'ARN dans des cellules vivantes [Jiang 10]. La profondeur de détection est généralement de quelques centaines de μm à quelques mm [Dong 11] et seule une étude mentionne des résultats jusqu'à 2 cm de profondeur [Liu 11].

Au-delà de l'imagerie optique simple, ces nanoparticules sont utilisées pour de l'analyse biochimique telle que la détection de protéines, d'ADN, et de l'imagerie de molécule unique. Elles présentent également un potentiel pour des techniques telles que la tomographie, l'imagerie multimodale, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la photothérapie [Gnach 12, Wang 10].

Conclusion

Si les nanoparticules GSH présentent de nombreux intérêts en imagerie, d'autres nouveaux nanomatériaux peuvent également être envisagés dans le cadre d'applications biologiques. Pour terminer, certaines particules métalliques, d'or ou d'argent principalement, possèdent la possibilité d'émettre de la GSH, du fait de la brisure de symétrie cristalline en surface. Cependant, l'émission optique de ce type est peu intense puisqu'elle ne provient que de la surface et non du volume, et reste sensible aux techniques de fonctionnalisation. L'utilisation de ces particules, assez reconnue par ailleurs pour leurs propriétés de diffusion, d'amplification plasmonique, voire d'excitation photothermique, n'est donc pour le moment pas envisagée dans le cadre d'émission GSH.

III Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu démontrer l'intérêt des nanoparticules aux propriétés de GSH pour l'imagerie biomédicale. En dehors de l'imagerie, d'autres applications peuvent être envisagées dans le domaine du vivant. Les techniques d'analyse et de diagnostic peuvent d'une part exploiter les propriétés optiques spécifiques des nanoparticules en vue d'une réduction des seuils de détection. Par exemple, il a été montré la possibilité de détecter des nanoparticules GSH uniques dans un milieu physiologique complexe par spectroscopie de corrélation non linéaire [Geissbuehler 12]. D'autre part, il est également envisagé des applications de type theranostic, où les particules pourraient générer localement un rayonnement UV (en changeant la longueur d'onde d'excitation), détruisant ainsi des cellules préalablement ciblées. Des premiers résultats encourageants ont été obtenus par les partenaires du projet Namdiatream. Enfin, des

travaux sont également menés afin de combiner différentes propriétés au sein d'une nanoparticule, comme par exemple l'émission optique GSH combinée à des propriétés magnétiques pour l'IRM ou radioactives pour la tomographie par émission de positons. Le développement de sondes multifonctionnelles permet d'allier différentes techniques complémentaires permettant par exemple de réaliser à la fois un diagnostic pré-opératoire puis un guidage intra-opératoire lors d'une opération de chirurgie.

Toutes ces applications prometteuses nécessitent toutefois une bonne maîtrise des méthodes et des phénomènes mis en jeu. Nous avons ainsi énoncé l'intérêt d'améliorer la technologie concernant la microscopie biphotonique, l'utilité de contrôler les techniques de synthèse et de fonctionnalisation, ainsi que l'importance de quantifier les réponses ONL des marqueurs.

Dans ce cadre, mon travail de thèse porte principalement sur la caractérisation optique non linéaire des matériaux sous forme de nanoparticules. Cet aspect est essentiel car il permet d'une part de mieux appréhender les phénomènes optiques mis en jeu, et ainsi de déterminer les paramètres influant le signal optique émis : matériaux et cristallinité, taille et forme des nanoparticules, concentration, agrégation, etc. L'objectif final de ce travail est de pouvoir aisément sélectionner les meilleurs marqueurs optiques potentiels.

Diffusion Hyper-Rayleigh ou de second harmonique : principe et configuration expérimentale

Introduction

La technique de diffusion Hyper-Rayleigh (HRS, acronyme anglais usuel pour Hyper-Rayleigh Scattering) consiste à étudier le rayonnement optique non linéaire diffusé par de nombreux éléments, dont la taille reste très inférieure à la longueur d'onde conformément au régime Rayleigh. Ces mesures d'ensemble sont utiles pour caractériser les propriétés optiques non linéaires de molécules. En effet, l'intensité GSH d'une molécule est très faible en raison de sa taille tandis que pour un échantillon constitué d'un ensemble de molécules, les intensités diffusées par chacune d'elle s'additionnent de manière incohérente pour donner un signal plus facilement détectable et exploitable. De plus, les mesures HRS résolues en polarisation permettent d'obtenir des informations spécifiques sur les propriétés optiques non linéaires des molécules étudiées, comme les coefficients indépendants du tenseur d'hyperpolarisabilité.

Dans ce chapitre, nous présenterons pour commencer la théorie HRS, permettant de comprendre les méthodes utilisées pour la caractérisation de molécules optiquement non linéaires. Après avoir explicité ces méthodes, leur application à des nanoparticules sera discutée, ce qui permettra d'établir les protocoles de mesures HRS exploitées par la suite. Nous détaillerons ensuite le système expérimental utilisé pour la réalisation de ces mesures optiques et terminerons par les méthodes de préparation et de caractérisation des échantillons nécessaires à l'analyse du signal HRS.

◇ Historique

La première observation du phénomène de GSH fut réalisée en 1961, peu après l'invention du laser [Franken 61]. Quelques années plus tard, en 1965, la diffusion de second harmonique (SH) est observée pour la première fois par Terhune et al [Terhune 65].

A la suite de cette découverte, la théorie relative à la technique HRS fut développée par Cyvin, incluant les conditions de symétrie de Kleinmann [Cyvin 65], puis de manière plus générale, c'est-à-dire sans prendre en compte ces conditions de symétrie [Bersohn 66].

D'un point de vue expérimental, une méthode permettant d'étudier les propriétés optiques non linéaires de molécules organiques, appelée EFISHG (pour Electric Field Induced Second Harmonic Generation), fut développée par [Kielich 68], pour laquelle l'application d'un champ électrique permet, par l'interaction avec les dipôles permanents de molécules polaires, de rompre la symétrie de la solution moléculaire et d'induire ce phénomène de SH [Levine 75].

En 1991, la technique HRS est mise au point afin de mesurer l'hyperpolarisabilité de toutes les molécules indépendamment de leur symétrie ou charge, incluant aussi celles ne possédant pas de moment dipolaire permanent [Clays 91, Hendrickx 98].

La technique HRS fut ensuite élargie à l'étude d'objets de taille supérieure à la taille moléculaire, tels que des assemblages moléculaires ou des particules de taille nanométrique à microscopique. Elle a été appliquée à l'étude d'objets non-centrosymétriques tels que des Quantum Dots semi-conducteurs de type

CdS, CdSe et ZnS [Jacobsohn 00, Zhang 01, Petrov 02] ou des particules d'oxydes comme le BaTiO₃, le PbTiO₃ ou le ZnO [Rodriguez 09, Le Dantec 11]. Elle a également été appliquée à des particules microscopiques de structure centrosymétrique dont la GSH provient de la brisure de symétrie en surface [Wang 96, Yan 98], ainsi qu'à des nanoparticules métalliques [Nappa 05, Russier-Antoine 07].

En parallèle, l'utilisation de mesures HRS résolues en polarisation a été développée, permettant ainsi de déterminer la symétrie des objets étudiés et plus précisément leurs coefficients ONL indépendants d_{ij} [Zyss 93, Verbiest 94]. La théorie relative à ces mesures fut formulée par [Kauranen 96]. D'autres travaux font état de ce type de mesures [Brasselet 98, Ostroverkhov 00, Lemailet 07, Revillod 08].

◇ Terminologie

La théorie HRS considère des objets ponctuels dipolaires qui diffusent le rayonnement de second harmonique selon le principe de diffusion Rayleigh. Cela signifie que le champ électromagnétique appliqué n'est pas modifié par l'objet. Cependant, au-delà d'une certaine taille, les particules modifient la phase et l'amplitude du champ incident. On considère que les objets de taille supérieure à 5-10 nm n'entrent plus dans la catégorie des sources ponctuelles. Le terme de diffusion Hyper-Rayleigh n'est alors plus adéquat [Roke 12].

Dans notre étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à des particules de structure cristalline non-centrosymétrique de diamètre moyen situé entre 50 et 200 nm et pour lesquelles le signal HRS provient uniquement du volume. Nous vérifierons en effet que la contribution de surface, c'est-à-dire l'intensité provenant de la rupture de symétrie en surface de la particule, est négligeable par rapport à la contribution de volume.

La terminologie de diffusion Hyper-Rayleigh est donc ici utilisée abusivement puisque la taille des objets diffusants est grande par rapport au régime Rayleigh avec un rayon $R > \lambda/50$. Ces objets ne sont donc plus considérés comme des sources ponctuelles. L'appellation correcte serait alors diffusion non linéaire (Non Linear Scattering en anglais, NLS) ou diffusion de second harmonique (Second Harmonic Scattering, SHS). Pour des raisons d'usage et considérant que les mesures sont réalisées sur un système expérimental HRS, le terme HRS est cependant utilisé dans la suite de ces travaux.

I Principe de la technique de diffusion Hyper-Rayleigh

I.1 Généralités

Lors d'une mesure HRS, une solution moléculaire est excitée par un faisceau laser intense, de fréquence ω . Chaque molécule est donc soumise à cette excitation et diffuse alors un signal de second harmonique. Le signal HRS correspond à la somme incohérente de tous ces signaux de SH.

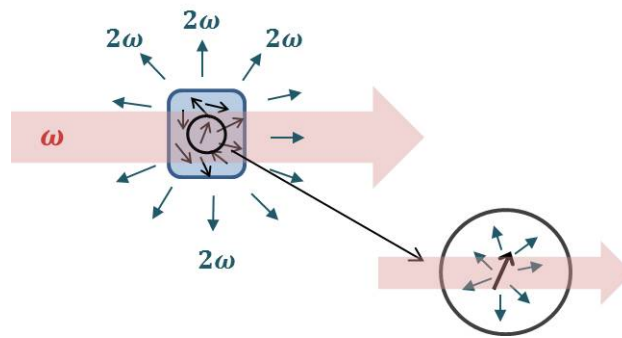


Figure 2.1 – Principe de la diffusion Hyper-Rayleigh (HRS).

Ce signal HRS est caractérisé par différents paramètres liés à l'échantillon mais également au système expérimental. Comme pour la GSH, le signal HRS varie de manière quadratique avec l'intensité incidente I_ω . De plus, comme il s'agit d'une mesure d'ensemble, la réponse optique dépend de la concentration moléculaire N de la solution et varie linéairement avec celle-ci puisqu'il s'agit de la somme de signaux

diffusés de manière incohérente. Par ailleurs, la diffusion de SH des molécules est directement liée à leur hyperpolarisabilité moyenne $\langle \beta \rangle$, corrigée par les facteurs de champs locaux F_i . Enfin, il faut aussi prendre en compte un facteur expérimental G .

Dans le cas où différentes espèces i sont en présence, l'intensité du signal HRS est définie par [Revillod 06] :

$$I_{2\omega} = G \sum_i (N_i F_i \langle \beta_i^2 \rangle) I_{\omega}^2 \quad (2.1)$$

Si l'échantillon correspond à une solution moléculaire constituée d'un solvant et d'une seule espèce de molécule, on a alors :

$$I_{2\omega} = G(N_s F_s \langle \beta_s^2 \rangle + N_m F_m \langle \beta_m^2 \rangle) I_{\omega}^2 \quad (2.2)$$

où les indices s et m correspondent respectivement au solvant et aux molécules en solution.

I.2 Détermination théorique du signal de diffusion

Nous venons de voir de manière générale que la réponse HRS d'un échantillon est caractérisée par ses propriétés ONL ainsi que par la configuration expérimentale. Nous présentons maintenant une approche plus détaillée [Revillod 06] basée sur les processus optiques mis en jeu, afin de déterminer les caractéristiques du signal HRS en fonction des conditions expérimentales.

◊ Moment dipolaire induit à 2ω d'une molécule

Lorsqu'un faisceau laser éclaire une solution de molécules, le champ local incident $E(\omega)$ induit un moment dipolaire $p_i^{2\omega}$ dans chacune d'elle, qui est à l'origine de la diffusion de second harmonique. Ce moment dipolaire dépend de l'hyperpolarisabilité moléculaire β_{ijk} qui est généralement définie dans le repère de la molécule. Dans ce repère, on a donc :

$$p_i^{2\omega} = \sum_{jk} \beta_{ijk} E_j E_k \quad (2.3)$$

Nous nous intéressons dans un premier temps à la diffusion de second harmonique par une seule molécule. En effet, les signaux de SH sont diffusés de manière incohérente par chaque molécule. Connaissant le signal émis par une seule molécule, il sera donc facile par la suite de retrouver le signal HRS global.

◊ Orientation du système

Le moment dipolaire moléculaire induit dépend des composantes j, k du champ incident. Il est donc nécessaire de le définir dans un repère du laboratoire (X, Y, Z) comme illustré sur la figure 2.2.

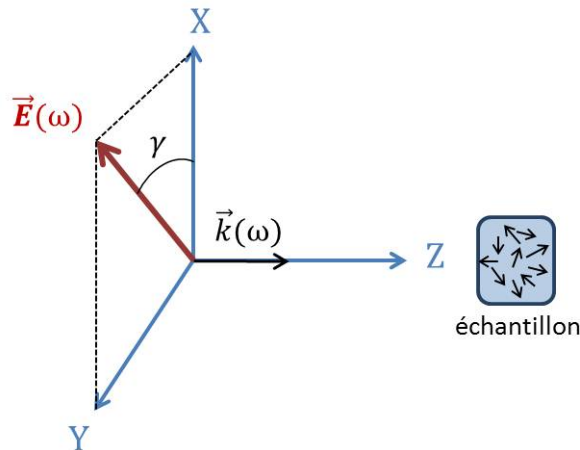


Figure 2.2 – Repère du laboratoire et champ incident.

Dans ce repère, le champ incident à la position \mathbf{r}' est de la forme :

$$E(\omega) = E_0 \begin{pmatrix} \cos(\gamma) \\ \sin(\gamma) \\ 0 \end{pmatrix}_{(X,Y,Z)} e^{i(\vec{k}_\omega \mathbf{r}' - \omega t)} \quad \text{avec : } \begin{cases} E_0 \text{ amplitude du champ} \\ \gamma \text{ angle de polarisation} \end{cases} \quad (2.4)$$

◇ **Propriétés ONL de la molécule dans le repère du laboratoire.**

Le tenseur d'hyperpolarisabilité moléculaire β_{ijk} est défini dans le repère de la molécule (x, y, z) . Afin de l'obtenir dans le repère du laboratoire, on effectue trois rotations successives définies par les angles d'Euler θ , ϕ et ψ comme présentés en figure 2.3. La convention adoptée ici est la convention ZYZ.

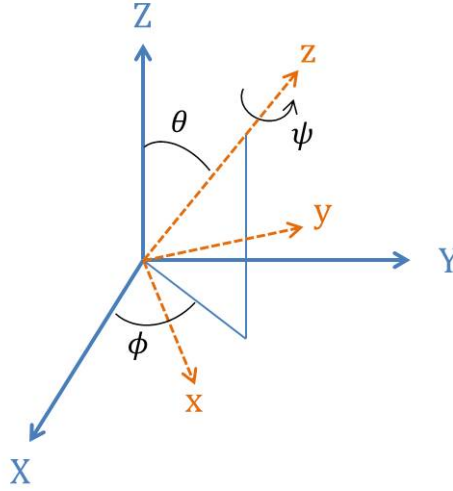


Figure 2.3 – Changement de repère entre le repère du laboratoire (X, Y, Z) et le repère de la molécule (x, y, z) .

La transformation $(x, y, z) \rightarrow (X, Y, Z)$ revient à appliquer la matrice S :

$$S = \begin{pmatrix} \cos(\psi)\cos(\theta)\cos(\phi) - \sin(\psi)\sin(\phi) & -\sin(\psi)\cos(\theta)\cos(\phi) - \cos(\psi)\sin(\phi) & \sin(\theta)\cos(\phi) \\ \cos(\psi)\cos(\theta)\sin(\phi) + \sin(\psi)\cos(\phi) & -\sin(\psi)\cos(\theta)\sin(\phi) + \cos(\psi)\cos(\phi) & \sin(\theta)\sin(\phi) \\ -\cos(\psi)\sin(\theta) & \sin(\psi)\sin(\theta) & \cos(\theta) \end{pmatrix} \quad (2.5)$$

Chaque élément du tenseur β_{IJK} , d'indices IJK associés aux axes XYZ du laboratoire, est déterminé en appliquant cette transformation S au tenseur β_{ijk} du repère moléculaire (x, y, z) . Cette transformation s'écrit :

$$\beta_{IJK(X,Y,Z)} = \sum_i \sum_j \sum_k S_{Ii} S_{Jj} S_{Kk} (\beta_{ijk})_{(x,y,z)} \quad (2.6)$$

A partir du tenseur d'hyperpolarisabilité moléculaire défini dans ce nouveau repère :

$$(\beta)_{(X,Y,Z)} = \begin{pmatrix} \beta_{XXX} & \beta_{XXY} & \beta_{XZZ} & \beta_{XYX} & \beta_{XYY} & \beta_{XZY} \\ \beta_{YXX} & \beta_{YYY} & \beta_{YZZ} & \beta_{YYX} & \beta_{YYZ} & \beta_{YZX} \\ \beta_{ZXX} & \beta_{ZYY} & \beta_{ZZZ} & \beta_{ZXX} & \beta_{ZYY} & \beta_{ZZX} \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

et de l'expression du produit $E(\omega).E(\omega)$ dans ce même repère :

$$E(\omega).E(\omega) = E_0^2 \begin{pmatrix} \cos^2(\gamma) \\ \sin^2(\gamma) \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 2\cos(\gamma)\sin(\gamma) \end{pmatrix}_{(XYZ)} e^{2i(\vec{k}_\omega \vec{r}' - \omega t)} \quad (2.8)$$

on peut facilement calculer le moment dipolaire induit à 2ω :

$$p^{2\omega} = E_0^2 \begin{pmatrix} \beta_{XXX}\cos^2(\gamma) + \beta_{XYY}\sin^2(\gamma) + 2\beta_{XXY}\cos(\gamma)\sin(\gamma) \\ \beta_{YXX}\cos^2(\gamma) + \beta_{YYX}\sin^2(\gamma) + 2\beta_{YXY}\cos(\gamma)\sin(\gamma) \\ \beta_{ZXX}\cos^2(\gamma) + \beta_{ZYY}\sin^2(\gamma) + 2\beta_{ZXY}\cos(\gamma)\sin(\gamma) \end{pmatrix} e^{2i(\vec{k}_\omega \vec{r}' - \omega t)} \quad (2.9)$$

◊ Champ rayonné à la fréquence double

Connaissant l'expression du moment dipolaire induit à 2ω pour une molécule, nous cherchons maintenant à déterminer le champ électromagnétique émis à la fréquence double. Ce champ correspond au champ rayonné par $p^{2\omega}$ et dépend de la direction d'observation.

Pour une direction de détection \vec{h} , le champ généré à la fréquence double en un point \mathbf{r} est donné par la relation [Jackson 75] :

$$\vec{E}(2\omega) = g[(\vec{h} \times \vec{p}^{2\omega}) \times \vec{h}] \quad \text{avec : } g = \frac{k_{2\omega}}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^{ik_{2\omega}|\vec{r}-\vec{r}'|}}{|\vec{r}-\vec{r}'|} \quad (2.10)$$

Comme nous utiliserons généralement une direction de détection perpendiculaire à l'excitation, on choisit $\vec{h} = \vec{Y}$. La configuration de détection est présentée ci-dessous.

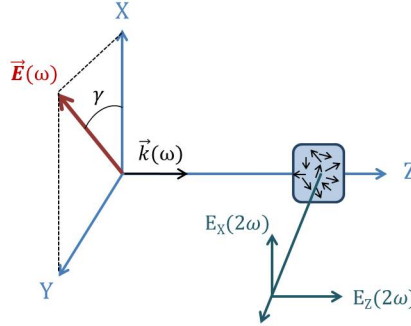


Figure 2.4 – Configuration géométrique de détection du signal HRS.

D'après les équations 2.9 et 2.10, nous obtenons alors l'expression dans le repère (X,Y,Z) du laboratoire du champ généré à la fréquence double par une molécule.

$$E(2\omega) = gE_0^2 \begin{pmatrix} \beta_{XXX}\cos^2(\gamma) + \beta_{XYY}\sin^2(\gamma) + 2\beta_{XXY}\cos(\gamma)\sin(\gamma) \\ 0 \\ \beta_{ZXX}\cos^2(\gamma) + \beta_{ZYY}\sin^2(\gamma) + 2\beta_{ZXY}\cos(\gamma)\sin(\gamma) \end{pmatrix} e^{i(2\vec{k}_\omega - \vec{k}_{2\omega})\vec{r}'} \quad (2.11)$$

Notons ici que le facteur $e^{i\omega t}$ n'est pas noté pour des raisons de simplicité et que le facteur g se simplifie selon l'approximation du champ lointain ($\mathbf{r}' \ll \mathbf{r}$) par $g = \frac{k_{2\omega}}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^{ik_{2\omega}|\vec{r}|}}{|\vec{r}|}$.

◇ Intensité HRS

Lors d'une mesure HRS expérimentale, nous n'observons pas directement le champ rayonné à la fréquence double mais l'intensité définie à partir du champ $E(2\omega)$ par :

$$I(2\omega) \propto E(2\omega)E^*(2\omega) \quad (2.12)$$

Pour déterminer l'intensité HRS globale, il faut alors prendre en compte l'ensemble des molécules et leurs orientations. Pour cela, on utilise le principe d'ergodicité selon lequel on considère que la moyenne des orientations d'un ensemble de N molécules à un instant t est équivalente à la moyenne temporelle sur toutes les orientations possibles d'une molécule unique. Cela revient à considérer le signal moyen issu d'une molécule pouvant prendre toutes les orientations possibles. Ce principe est vrai pour N objets sans interactions, ce qui est le cas pour des échantillons de concentration relativement faible. Les signaux de second harmonique diffusés par les différentes molécules sont en effet incohérents.

En pratique, il suffit de faire varier les paramètres d'orientation moléculaire définis par le schéma de changement de repère (fig. 2.3) et intégrer sur tout l'espace. En HRS, nous considérons donc des valeurs d'hyperpolarisabilités moyennes $\langle \beta \rangle$, pour lesquelles la notation $\langle \rangle$ indique une moyenne dans toutes les directions de l'espace.

Les calculs d'intensité HRS, de la forme $E(2\omega)E^*(2\omega)$, impliquent l'utilisation des coefficients $\langle \beta_{IKL}\beta_{JMN}^* \rangle$, déterminés de la façon suivante :

$$\langle \beta_{IKL}\beta_{JMN}^* \rangle = \frac{1}{8\pi^2} \int_{\phi=0}^{2\pi} \int_{\psi=0}^{2\pi} \int_{\theta=0}^{\pi} \beta_{IKL}(\phi, \psi, \theta) \beta_{JMN}^*(\phi, \psi, \theta) \sin(\theta) d\theta d\psi d\phi \quad (2.13)$$

◇ Exemple d'intensité HRS détectée

Pour une détection selon \vec{Y} , il est donc possible de déterminer l'intensité HRS selon les deux directions de polarisation I_X et I_Z . Par exemple, si $\gamma = 0$, le champ rayonné dans la direction Y et polarisé suivant X est, d'après l'équation 2.11.

$$E_X(2\omega) \propto \langle \beta_{XXX} \rangle \quad (2.14)$$

On calcule alors l'intensité I_X (eqn. 2.12) par :

$$I_X \propto E_X(2\omega)E_X^*(2\omega) = GNF \langle \beta_{XXX}\beta_{XXX}^* \rangle I_\omega^2 \quad (2.15)$$

$$avec \begin{cases} G \text{ constante} \\ N \text{ nombre de molécules} \\ F = F_l^2 \text{ facteur de champ local (eqn. 1.13)} \\ I_\omega^2 = E_0^4, \text{ carré de l'intensité du champ incident.} \end{cases}$$

Formellement, le calcul de l'intensité fait apparaître des constantes comme ϵ_0 , λ et c (voir [Hendrickx 98] ou [Revillod 06] pour une expression complète). Expérimentalement, l'intensité récoltée dépend également de l'angle solide de détection et des instruments utilisés en optique et pour la détection, facteurs généralement inclus dans la constante G .

L'intensité I_Z est définie de la même manière :

$$I_Z = GNF \langle \beta_{ZXX}\beta_{ZXX}^* \rangle I_\omega^2 \quad (2.16)$$

ce qui permet d'écrire l'intensité HRS détectée avec une excitation polarisée verticalement et sans polariseur devant le système de détection :

$$I(2\omega) = I_X + I_Z = GNF(\langle \beta_{XXX}^2 \rangle + \langle \beta_{ZXX}^2 \rangle) I_\omega^2 \quad (2.17)$$

Les coefficients $\langle \beta_{IJK} \rangle$ sont considérés réels dans le cas de non-linéarités purement dispersives, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a pas d'absorption [Kauranen 96]. Dans le cas contraire, la notation $\langle \beta_{IJK}\beta_{IJK}^* \rangle$ doit être conservée.

I.3 Mesures résolues en polarisation

Nous avons, dans la section précédente, déterminé l'intensité HRS dans une configuration particulière, pour laquelle la polarisation incidente est fixée verticalement. Nous allons maintenant nous intéresser à l'expression de cette intensité HRS dans un cas plus général. L'utilité d'une analyse en polarisation est de pouvoir identifier distinctement des coefficients indépendants du tenseur d'hyperpolarisabilité. En effet, nous verrons que les coefficients $\langle \beta_{IJK} \rangle$ impliqués dans l'expression de l'intensité HRS ne sont pas toujours les mêmes lorsque la polarisation incidente γ varie. Cela se traduit par la modification de l'intensité détectée.

Reprenons le calcul de l'intensité HRS déterminé par l'équation 2.12, à partir de l'expression générale 2.11 du champ à 2ω émis dans la direction Y. L'intensité selon X s'écrit :

$$I_X = GNF I_\omega^2 (\langle \beta_{XXX}^2 \rangle \cos^4 \gamma + \langle \beta_{XXY}^2 \rangle \sin^4 \gamma + (4 \langle \beta_{XXY}^2 \rangle + 2 \langle \beta_{XXX} \beta_{XXY} \rangle) \cos^2 \gamma \sin^2 \gamma) \quad (2.18)$$

Notons ici que certains coefficients s'annulent par l'opération de moyenne orientationnelle décrite par l'équation 2.13. En particulier, pour I_X , on a $\langle \beta_{XXX} \beta_{XXY} \rangle = 0$ et $\langle \beta_{XXY} \beta_{XXY} \rangle = 0$.

De plus, on considère en HRS une émission isotrope provenant de la sommation incohérente de molécules ponctuelles. Pour des raisons de symétrie, il existe alors des équivalences entre les différentes composantes $\langle \beta_{IJK}^2 \rangle$ [Brasselet 98], ce qui permet de réécrire cette intensité plus simplement, en supposant les conditions de Kleinman :

$$I_X = GNF I_\omega^2 (\langle \beta_{XXX}^2 \rangle \cos^2 \gamma + \langle \beta_{ZXX}^2 \rangle \sin^2 \gamma) \quad (2.19)$$

De la même manière, on obtient pour I_Z :

$$I_Z = GNF I_\omega^2 \langle \beta_{ZXX}^2 \rangle \quad (2.20)$$

Ainsi, lorsque l'on fait varier l'angle de polarisation incidente, les intensités HRS détectées selon X ou Z peuvent être représentées par des graphes polaires tels que ceux de la figure 2.5.

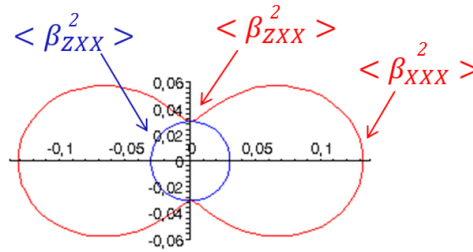


Figure 2.5 – Intensités HRS théoriques I_X (en rouge) et I_Z (en bleu) en fonction de la polarisation incidente γ pour une solution de pNA.

I.4 Méthodes de caractérisation des coefficients ONL

La technique HRS permet de déterminer l'hyperpolarisabilité moyenne $\langle \beta \rangle$ d'une molécule ou encore ses coefficients indépendants β_{ij} . Nous allons à présent détailler les méthodes utilisées pour cela.

I.4.a Détermination des coefficients moyens $\langle \beta \rangle$

La méthode de détermination par HRS de l'hyperpolarisabilité moyenne de molécules en solution a été présentée en 1991 par [Clays 91]. Elle est basée sur le principe selon lequel l'intensité HRS diffusée dépend

linéairement de la concentration en molécules, comme nous l'avons vu au début de ce chapitre. En faisant varier la concentration des solutions, il est possible d'observer ce comportement linéaire de l'intensité HRS et, à partir du coefficient directeur de cette droite, de retrouver l'hyperpolarisabilité moléculaire. Deux méthodes ont été développées dans ce cadre [Verbiest 09].

◊ Méthode de la référence interne

La méthode de la référence interne consiste à mesurer l'intensité HRS de solutions de différentes concentrations moléculaires, et à déterminer le coefficient directeur ainsi que l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue. Selon la formulation générale du signal HRS (eqn. 2.2), en supposant une solution moléculaire constituée d'un solvant et d'une espèce de molécule, on a :

$$I_{2\omega} = G(N_s F_s < \beta_s^2 > + N_m F_m < \beta_m^2 >) I_\omega^2$$

avec m l'indice correspondant aux molécules. Dans ce cas, le champ local est le même pour les molécules et pour le solvant soit $F_s = F_m = F$.

La figure 2.6 (a) présente l'intensité HRS en fonction de l'intensité d'excitation pour des solutions moléculaires de para-nitroaniline (pNA) de différentes concentrations [Clays 91]. On note ici la dépendance en I_ω^2 pour chaque solution ainsi que la variation d'intensité HRS en fonction de la concentration pour une intensité incidente égale.

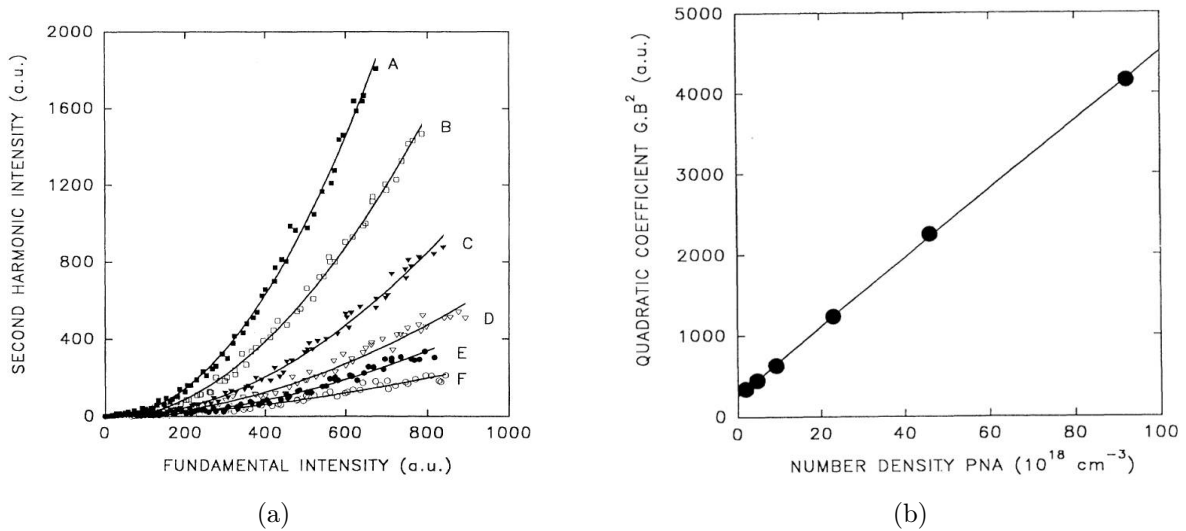


Figure 2.6 – (a) Intensité HRS de solutions de pNA/méthanol à différentes concentrations A, B, C, D, E et F. (b) Coefficient quadratique des mêmes solutions en fonction de leur concentration. *Extrait de [Clays 91].*

A partir de ces courbes, on peut déterminer le facteur $G(N_s F < \beta_s^2 > + N_m F < \beta_m^2 >)$ pour chaque solution. Le résultat est présenté sur la figure 2.6 (b). La droite obtenue est donc de la forme :

$$I_{2\omega} = \alpha N_m + y_0 \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \alpha = GF < \beta_m^2 > \\ y_0 = GN_s F < \beta_s^2 > \end{cases} \quad (2.21)$$

Connaissant la concentration N_s et l'hyperpolarisabilité $< \beta_s >$ du solvant, il est alors relativement facile de retrouver l'hyperpolarisabilité de la molécule étudiée :

$$< \beta_m^2 > = \frac{\alpha}{y_0} N_s < \beta_s^2 > \quad (2.22)$$

Cette méthode est assez facile à mettre en place puisqu'elle nécessite en pratique de mesurer simplement l'intensité HRS de solutions moléculaires de différentes concentrations avec une même intensité

d'excitation. Cependant, elle n'est pas toujours applicable. D'une part, les concentration et hyperpolarisabilité du solvant ne sont pas toujours connues et d'autre part, l'hyperpolarisabilité du solvant est parfois nulle ou trop faible pour être détectée, ce qui correspond à une ordonnée à l'origine nulle.

◊ Méthode de la référence externe

Lorsque la méthode de la référence interne ne peut être utilisée, il est possible d'employer une autre méthode, utilisant une référence externe. Le principe repose sur la même dépendance en concentration que pour la référence interne mais fait appel cette fois, à une autre solution d'hyperpolarisabilité connue.

On calibre dans un premier temps le système expérimental avec cette solution de référence r , en mesurant l'intensité HRS pour des solutions de concentrations connues. Cela permet de déterminer la constante G . Théoriquement, l'intensité HRS est telle que :

$$I_{2\omega}(r) = G(N_{s1}F_r < \beta_{s1}^2 > + N_r F_r < \beta_r^2 >) I_{\omega}^2$$

On obtient une droite de la forme :

$$I_{2\omega}(r) = \alpha_r N_r + y_1 \quad \text{avec } \alpha_r = G F_r < \beta_r^2 > I_{\omega}^2 \quad (2.23)$$

Ensuite, on effectue une deuxième série de mesures sur la solution à étudier, pour des concentrations variables. L'intensité HRS théorique est telle que :

$$I_{2\omega}(m) = G(N_{s2}F_m < \beta_{s2}^2 > + N_m F_m < \beta_m^2 >) I_{\omega}^2$$

L'intensité détectée est de la forme :

$$I_{2\omega}(m) = \alpha_m N_m + y_2 \quad \text{avec } \alpha_m = G F_m < \beta_m^2 > I_{\omega}^2 \quad (2.24)$$

Par simple comparaison des coefficients directeurs, il est alors possible de déterminer l'hyperpolarisabilité de la molécule étudiée :

$$< \beta_m > = \sqrt{\frac{\alpha_m}{\alpha_r} \frac{F_r}{F_m}} < \beta_r > \quad (2.25)$$

Il est intéressant ici de noter que le solvant utilisé dans chaque cas n'est pas toujours le même, impliquant des facteurs de champ local différents. Il est alors nécessaire de connaître ces facteurs et donc les indices de réfraction des différents milieux.

I.4.b Détermination des coefficients indépendants β_{ij}

◊ Rapport de dépolarisation

Le rapport de dépolarisation D_{pol} permet de retrouver les coefficients indépendants du tenseur β_{ijk} à partir de l'information des mesures résolues en polarisation. Ce facteur est défini comme le rapport des intensités HRS minimale et maximale, soit :

$$D_{pol} = \frac{< \beta_{ZZX}^2 >}{< \beta_{XXX}^2 >} \quad (2.26)$$

Ce rapport est facile à mesurer expérimentalement, soit en mesurant l'intensité I_X pour des polarisations incidentes horizontale puis verticale, soit en mesurant les intensités I_X et I_Z pour une polarisation incidente verticale ($\gamma = 0$). On utilise ce rapport de dépolarisation pour caractériser la symétrie ONL pour des molécules dont le tenseur comporte uniquement 2 composantes indépendantes non nulles.

Prenons par exemple le pNA dont le tenseur est donné (annexe B) dans le repère de la molécule. Les coefficients $< \beta_{ZZX}^2 >$ et $< \beta_{XXX}^2 >$ s'écrivent d'après l'équation 2.6 comme :

$$< \beta_{XXX}^2 > = \frac{1}{7} \beta_{33}^2 + \frac{6}{35} \beta_{33} \beta_{31} + \frac{9}{35} \beta_{31}^2 \quad (2.27)$$

$$\langle \beta_{ZZX}^2 \rangle = \frac{1}{35} \beta_{33}^2 - \frac{2}{105} \beta_{33} \beta_{31} + \frac{11}{105} \beta_{31}^2 \quad (2.28)$$

L'expression du rapport de dépolarisation peut alors s'écrire en fonction du rapport $R = \frac{\beta_{31}}{\beta_{33}}$:

$$D_{pol} = \frac{3 - 2R + 11R^2}{15 + 18R + 27R^2} \quad (2.29)$$

Cette équation $D_{pol}(R)$ est représentée par la courbe de la figure 2.7. La mesure du rapport de dépolarisation permet de déterminer un ou deux facteurs R correspondants, parmi lesquels une seule valeur est possible. Cela permet ensuite de retrouver le rapport des deux coefficients indépendants β_{ij} et donc leur valeur relative.

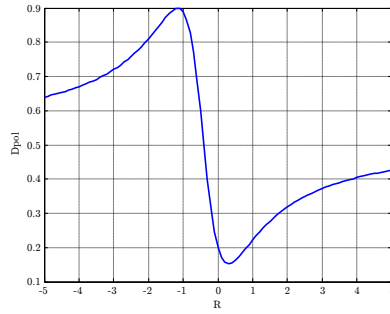


Figure 2.7 – Rapport de dépolarisation en fonction du facteur R pour le pNA.

Les valeurs absolues de ces coefficients indépendants peuvent ensuite être retrouvées à partir des valeurs moyennes d'hyperpolarisabilités $\langle \beta \rangle$.

I.5 Conclusion

Dans cette partie, la théorie sur laquelle repose la technique HRS a été explicitée. Nous avons également pu voir les différentes méthodes utilisées permettant de retrouver les coefficients moyens et indépendants du tenseur d'hyperpolarisabilité de molécules. Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons comment ces méthodes sont mises en pratique et appliquées à des particules.

II Mesures HRS sur des nanocristaux

L'objectif de cette section est de détailler les protocoles utilisés dans ce travail pour les caractérisations ONL quadratiques des nanocristaux. Ces protocoles sont définis à partir du principe HRS (cf. § I) et des méthodes qui en découlent, décrites précédemment au paragraphe I.4. Rappelons cependant que ces méthodes sont initialement utilisées pour la caractérisation de solutions moléculaires et non pour des nanocristaux. Nous allons voir ici comment appliquer ces méthodes à des suspensions de nanocristaux. Nous détaillerons ensuite les protocoles de mesures utilisés.

II.1 Application de la théorie HRS aux nanocristaux

II.1.a Caractérisation HRS de nanocristaux dans la littérature

La particularité de l'application de la théorie HRS à des nanocristaux provient du fait que le signal de second harmonique n'est pas diffusé par des molécules d'hyperpolarisabilité microscopique mais par des particules cristallines dont les propriétés sont généralement connues à échelle macroscopique, pour des cristaux massifs par exemple.

Dans la littérature, la majorité des études [Jacobsohn 00, Santos 00, Zhang 01, Jacobsohn Eilon 01, Petrov 02, Segets 09] déterminent dans un premier temps l'hyperpolarisabilité microscopique des particules de la même manière que pour des molécules, c'est-à-dire en utilisant :

$$I_{2\omega} = B(N_s < \beta_s^2 > + N_{np} < \beta_{np}^2 >) I_\omega^2 \quad (2.30)$$

avec B une constante incluant G et les facteurs de champ locaux, N_s et N_{np} les concentrations respectives du solvant et des nanoparticules en solution et $< \beta_s >$ et $< \beta_{np} >$ les moyennes orientationnelles des hyperpolarisabilités du solvant et des nanocristaux. Il est ensuite possible de retrouver l'hyperpolarisabilité moléculaire relative à ce matériau en considérant l'unité de formule par particule. Par exemple, pour une suspension de cristaux de CdS dont la concentration en unités CdS est donnée par N_{unit} , l'hyperpolarisabilité moléculaire équivalente est telle que : $< \beta_{mol}^2 > = N_{unit}/N_{nc} < \beta_{np}^2 >$, avec N_{unit}/N_{np} étant également définie comme la densité d'unités CdS par particule.

Cependant, la comparaison au matériau massif est plus délicate. En effet, ces valeurs d'hyperpolarisabilités sont microscopiques tandis que les susceptibilités moyennes d'ordre 2 déterminées pour les cristaux massifs sont macroscopiques. Afin de contourner cette difficulté, l'hyperpolarisabilité "massive" microscopique équivalente est calculée à partir de la susceptibilité macroscopique d (dont la valeur est mesurée par ailleurs sur des cristaux massifs) et en tenant compte des facteurs de champ local F_l (eqn. 1.13) et de la concentration en unités moléculaires de la solution N_{unit} selon : $\beta_{massif} = d/(N_{unit} \cdot F_l)$ [Santos 00, Zhang 02]. Cette hyperpolarisabilité microscopique peut ainsi être comparée aux hyperpolarisabilités mesurées sur des particules.

On constate dans ces exemples que l'application de la technique HRS à des nanocristaux ne permet de déterminer directement la susceptibilité de second ordre du matériau. Afin de remédier à cette difficulté, nous introduisons ici la notion d'hyperpolarisabilité effective d'une particule.

II.1.b Notion d'hyperpolarisabilité effective d'un nanocristal

Nous avons vu précédemment qu'un rayonnement intense induit dans une molécule un moment dipolaire à la fréquence double $p_{2\omega}$. Dans un matériau solide, le même rayonnement crée de manière similaire des dipôles électriques microscopiques, dont la densité est à l'origine d'une polarisation macroscopique dans le cristal.

Pour une molécule, le moment dipolaire ainsi induit est directement lié à l'hyperpolarisabilité moléculaire, comme défini par la relation 1.10. Cette hyperpolarisabilité est ensuite reliée au coefficient macroscopique d par un facteur de champ local traduisant l'interaction entre le champ incident et le milieu environnant de la molécule.

Lorsque l'on travaille avec des nanocristaux, il est intéressant de pouvoir relier facilement leurs propriétés optiques non linéaires de second ordre à celles du matériau, sans connaître nécessairement les propriétés des molécules qui la constituent. Pour cela, nous introduisons la notion d'hyperpolarisabilité effective.

Caractérisant les propriétés ONL de second ordre, l'hyperpolarisabilité effective d'un nanocristal β_{eff} est une non-linéarité effective volumique qui ne doit pas être confondue avec une hyperpolarisabilité moléculaire.

On rappelle l'équation 1.12 qui relie une hyperpolarisabilité moléculaire β_{mol} au coefficient macroscopique d :

$$d = N_{mol} f_\omega^2 f_{2\omega} \beta_{mol}$$

Par analogie, on définit l'hyperpolarisabilité effective d'un nanocristal comme l'hyperpolarisabilité de la somme de ses dipôles à laquelle on inclut un facteur de champ local f_ω tel que :

$$\beta_{eff} = N_{dip} f_\omega^2 f_{2\omega} \beta_{dip} \quad (2.31)$$

N_{dip} correspond au nombre total de dipôles d'hyperpolarisabilité microscopique β_{dip} dans le nanocristal. Pour un nanocristal de volume V_{nc} et de densité volumique de dipôles N_v , on a $N_{dip} = N_v V_{nc}$.

Par ailleurs, un nanocristal d'hyperpolarisabilité effective β_{eff} ne prend pas en compte le champ local tel que défini au chapitre I (cf. § 1.3) puisqu'il s'agit d'une grandeur effective volumique. Cependant,

comme le champ incident traverse successivement deux milieux d'indices différents (le solvant et la nanoparticule cristalline) cela modifie le champ macroscopique. A l'intérieur de cette particule, on a donc un champ intérieur macroscopique E_{int} qui est relié au champ incident E par un facteur de champ interne t_ω [Jackson 75] tel que :

$$E_{int} = t_\omega E = \frac{3n_s^2(\omega)}{2n_s^2(\omega) + n_p^2(\omega)} E \quad (2.32)$$

Ce facteur de champ interne a les mêmes propriétés que le facteur de champ local. Dans le cas de la génération de second harmonique, le facteur T nécessaire à la détermination de la polarisation non linéaire est de la même forme que le facteur de champ local F défini au chapitre 1, soit :

$$T = (t_\omega^2 t_{2\omega})^2 \quad (2.33)$$

Il est intéressant de constater que dans le régime Rayleigh, l'hyperpolarisabilité effective d'une particule dépend de son volume. En d'autres termes, le terme $\langle \beta_{eff} \rangle$ caractérise les propriétés de GSH des nanocristaux en tant que tels, c'est-à-dire en fonction des propriétés du matériau massif. Elle permet également de retrouver les propriétés propres au matériau $\langle d \rangle$ en divisant par le volume des cristaux. Il est possible de relier cette caractéristique au coefficient macroscopique d . On rappelle ici la convention I utilisée (cf. § 1.1, ch.1) pour laquelle la polarisation macroscopique vaut $P^{2\omega} = d E^2$ et le moment dipolaire moléculaire $p^{2\omega} = \beta E_{lc}^2$. A partir de l'équation (2.31), on obtient :

$$d = \frac{N_v}{N_{dip}} \beta_{eff} = \frac{\beta_{eff}}{V_{nc}} \quad (2.34)$$

L'hyperpolarisabilité effective permet donc de déterminer les caractéristiques ONL de la particule sans connaître l'hyperpolarisabilité moléculaire ou dipolaire mise en jeu. Cela a pour avantage de relier facilement cette caractéristique aux propriétés ONL du matériau massif, simplement en considérant le volume de la particule. Le signal HRS d'un ensemble de nanocristaux d'hyperpolarisabilité effective moyenne $\langle \beta_{eff} \rangle = \langle \beta_{nc} \rangle$, en suspension dans un solvant, est donc déterminé selon l'équation 2.2 :

$$I_{2\omega} = G(N_s F_s \langle \beta_s^2 \rangle + N_{nc} T_{nc} \langle \beta_{nc}^2 \rangle) I_\omega^2 \quad (2.35)$$

où N_{nc} est le nombre de nanocristaux par unité de volume et T_{nc} le facteur de champ interne. Dans la suite de ce travail, on simplifiera la notation en utilisant N pour N_{nc} , T pour T_{nc} , $\langle \beta^2 \rangle$ pour $\langle \beta_{nc}^2 \rangle$, et le volume V_{nc} des nanocristaux sera noté V .

II.2 Coefficients moyens $\langle \beta \rangle$ et $\langle d \rangle$: méthode par référence externe appliquée aux particules

Dans ce travail, nous travaillons généralement avec des solvants, comme l'eau ou l'éthanol, dont l'hyperpolarisabilité est faible par rapport aux hyperpolarisabilités de particules. Nous utilisons donc la méthode par référence externe, en choisissant pour référence la molécule de *para*-nitroaniline (pNA). Cette méthode, développée pour des molécules, peut s'adapter à des nanoparticules considérées comme des sources ponctuelles, mais il est nécessaire de définir précisément les facteurs de champ local et/ou interne correspondants.

♦ Conventions et référence utilisée

Le coefficient moyen est appelé ainsi parce qu'il caractérise un ensemble de cristaux sans orientation particulière mais également parce qu'il représente une valeur globale du tenseur d'hyperpolarisabilité. Cette valeur globale, qui dépend des différentes composantes du tenseur, est définie pour une configuration optique particulière.

Dans le cadre de ce travail, la configuration choisie est celle présentée dans la figure 2.4 avec une intensité incidente polarisée verticalement et une détection sans analyseur, perpendiculaire au faisceau incident. L'intensité HRS correspondante $I_X + I_Z$, définie par l'équation 2.17 est notée :

$$I(2\omega) = GNT \langle \beta^2 \rangle I_\omega^2 \quad (2.36)$$

Le coefficient moyen attribué aux cristaux $\langle \beta \rangle$ ainsi déterminé correspond alors à la combinaison de deux coefficients tels que :

$$\langle \beta^2 \rangle = \langle \beta_{xxx}^2 \rangle + \langle \beta_{zzx}^2 \rangle \quad (2.37)$$

La molécule de référence utilisée est le pNA, d'hyperpolarisabilité moyenne donnée dans la littérature par $\beta_{litt} = \beta_{33} = 25,9 \cdot 10^{-30} esu$ [Huyskens 98]. Le coefficient moyen correspondant à notre configuration expérimentale est présenté dans l'annexe B. On obtient un coefficient moyen de référence $\langle \beta_{pNA} \rangle = \sqrt{\frac{6}{35}} \beta_{33}$.

◊ Échantillons

La mise en place de la méthode de détermination des coefficients moyens $\langle \beta \rangle$ et $\langle d \rangle$ nécessite en premier lieu la préparation des échantillons à mesurer, à savoir :

- une solution de para-nitroaniline(pNA) dilué dans du méthanol, de concentration connue
- une suspension de nanoparticules.

La concentration en nanocristaux N ne peut être directement connue en raison de la méthode de préparation des suspensions colloïdales. La technique de détermination par pesée que l'on décrira par la suite (cf. § IV.2.d) permet, dans un premier temps, de connaître la concentration massique C_0 .

Ensuite, on réalise une mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS, pour Dynamic Light Scattering), de manière à obtenir un diamètre moyen D des particules. La taille des nanocristaux ainsi mesurée permet ensuite de déterminer leur volume, en supposant que les particules sont sphériques. La concentration N est ensuite calculée à partir de ce volume.

L'étape suivante consiste à effectuer plusieurs dilutions de chacun de ces échantillons afin de préparer un panel d'échantillons de concentrations différentes. En ce qui concerne le pNA, on utilise généralement des solutions finales de concentrations allant de 0,05 M à 0,25 M. La suspension colloïdale est elle diluée de manière à obtenir au minimum quatre échantillons de concentrations relatives C/C_0 comprises entre 0,1 et 1.

◊ Mesures optiques

Lorsque les échantillons sont prêts, ils sont caractérisés par la technique HRS, dans la configuration présentée précédemment (fig. 2.4), c'est-à-dire pour un faisceau incident polarisé verticalement et sans analyseur en détection. La puissance laser est réglée identiquement pour toutes les acquisitions.

Pour chaque échantillon de pNA et de nanoparticules, l'intensité HRS détectée est tracée en fonction de la concentration. On obtient alors deux courbes en intensité à 2ω telles que :

$$I_{pNA} = \alpha'_{pNA} C_{pNA} + y_0$$

et pour la suspensions colloïdale :

$$I_{nc} = \alpha'_{nc} \frac{C}{C_0} + y'_0$$

◊ Dépouillement

Les deux pentes α'_{pNA} et α'_{nc} sont ensuite utilisées pour le dépouillement. Celui-ci fait appel au calcul :

- du facteur de champ local F du pNA, dépendant de l'indice de réfraction du méthanol n_m . En considérant $n_m(\omega) \sim n_m(2\omega)$ aux longueurs d'onde de 1064 nm et 532 nm, on a :

$$F = \left(\frac{n_m^2 + 2}{3} \right)^6$$

- du facteur de champ interne T de la nanoparticule, dépendant des indices de réfraction n_s du solvant utilisé (eau ou éthanol) et n_{nc} du matériau de la particule . Dans la même approximation que pour l'indice du méthanol, on a :

$$T = \left(\frac{3n_s^2}{2n_s^2 + n_{nc}^2} \right)^6$$

- de la concentration N en nanoparticules qui est estimée à partir de la concentration massique C_0 , de la taille moyenne des nanoparticules D et de la masse volumique du matériau ρ :

$$N = \frac{C_0}{\rho \pi/6 D^3}$$

Si le paramètre α'_{pNA} expérimental est obtenu en fonction de la concentration molaire, il est à exprimer en fonction de la concentration moléculaire, au moyen de la constante d'Avogadro $\mathcal{N}_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

$$\alpha_{pNA} = \frac{\alpha'_{pNA}}{\mathcal{N}_A}$$

Le paramètre α'_{nc} est lui obtenu en fonction de la concentration massique relative. Pour l'avoir en fonction de la concentration N en particules :

$$\alpha_{nc} = \frac{\alpha'_{nc}}{N}$$

D'après le modèle de la méthode de la référence externe, l'équation 2.25 s'écrit dans notre cas :

$$\langle \beta \rangle = \sqrt{\frac{\alpha_{nc}}{\alpha_{pNA}} \frac{F_{pNA}}{T}} \langle \beta_{pNA} \rangle \quad (2.38)$$

On précise ici que $\langle \beta \rangle = \sqrt{\langle \beta^2 \rangle}$. Il reste donc à calculer le coefficient moyen $\langle \beta \rangle$ à partir de la valeur de $\langle \beta_{pNA} \rangle = \sqrt{\frac{6}{35}} 25,9 \cdot 10^{-30}$.

Le coefficient moyen $\langle d \rangle$ est obtenu à partir de $\langle \beta \rangle$, connaissant le volume des particules, selon l'équation 2.34. On le détermine alors à partir du diamètre moyen des particules en suspension par :

$$\langle d \rangle = \frac{\langle \beta \rangle}{V} \quad (2.39)$$

Conclusion

Ce protocole de mesure, basé sur la méthode de référence externe, permet de retrouver, grâce à la technique HRS, les coefficients moyens $\langle \beta \rangle$ et $\langle d \rangle$ de nanocristaux en suspension. Dans le chapitre 3, nous étudierons plus en détail les premiers résultats et les limitations de cette approche.

II.3 Coefficients indépendants d_{ij}

La détermination des coefficients indépendants est basée sur les mesures résolues en polarisation décrites au paragraphe I.3.

II.3.a Méthode du rapport de dépolarisation

La méthode de détermination des coefficients pour les tenseurs "simples", c'est-à-dire avec au maximum deux coefficients indépendants, est établie à partir de la mesure du rapport de dépolarisation (cf. § I.4.b), lequel permet de retrouver le rapport des coefficients indépendants $R = \frac{\beta_{31}}{\beta_{33}}$.

Expérimentalement, la mesure est réalisée à partir d'un échantillon de nanoparticules en suspension. Comme la mesure permet de déterminer des coefficients propres au matériau, c'est-à-dire dépendant directement des propriétés du tenseur β_{ij} , la caractérisation en taille n'est pas nécessaire ici, dans la mesure où les particules sont considérées sphériques et suffisamment petites pour être assimilées à des sources ponctuelles. La concentration des suspensions n'entre pas a priori en compte dans ce type d'analyse.

La mesure optique est réalisée à l'aide du banc expérimental HRS. L'objectif est de déterminer le rapport de dépolarisation à partir de différents états de polarisation de la lumière incidente. En pratique,

la configuration utilisée consiste à faire varier la polarisation linéaire du faisceau incident, selon l'angle γ défini dans la figure 2.2, au moyen d'une lame demi-onde située entre le laser et l'échantillon. Le banc de détection est situé perpendiculairement à l'axe d'excitation, comme dans l'exemple théorique.

Pour une acquisition avec analyseur, on sait que le signal est de la forme :

$$\begin{aligned} I_X &= \langle \beta_{XXX}^2 \rangle \cos^2 \gamma + \langle \beta_{ZXX}^2 \rangle \sin^2 \gamma \\ &= (\langle \beta_{XXX}^2 \rangle - \langle \beta_{ZXX}^2 \rangle) \cos^2 \gamma + \langle \beta_{ZXX}^2 \rangle \end{aligned}$$

Il peut paraître aisé de relever simplement les minimum et maximum de l'intensité par simple lecture afin de connaître le rapport $\langle \beta_{ZXX}^2 \rangle / \langle \beta_{XXX}^2 \rangle$. Cependant, les courbes expérimentales sont souvent bruitées et il est alors intéressant d'utiliser une fonction de fit pour avoir une meilleure approximation.

A partir de la valeur du rapport de dépolarisation, le rapport $R = \frac{d_{31}}{d_{33}}$ peut alors être obtenu par lecture graphique. Pour des matériaux tels que BaTiO₃ ou ZnO, dont le tenseur d'hyperpolarisabilité est donné au chapitre 1, on a :

$$\langle \beta_{ZXX}^2 \rangle = \frac{1}{35} \beta_{33}^2 - \frac{4}{105} \beta_{31} \beta_{33} + \frac{4}{21} \beta_{31}^2 \quad (2.40)$$

$$\langle \beta_{XXX}^2 \rangle = \frac{1}{7} \beta_{33}^2 + \frac{12}{35} \beta_{31} \beta_{33} + \frac{24}{35} \beta_{31}^2 \quad (2.41)$$

$$D_{pol} = \frac{3 - 4R + 20R^2}{15 + 36R + 72R^2} \quad (2.42)$$

Le rapport de dépolarisation en fonction de R est représenté dans ce cas sur la figure 2.8.

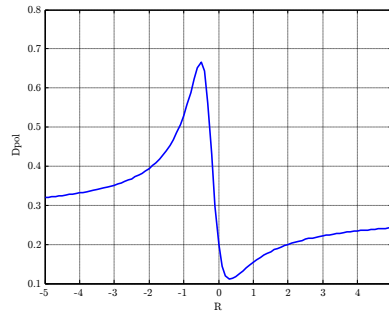


Figure 2.8 – Rapport de dépolarisation en fonction du facteur R pour une maille cristalline de même symétrie que le BaTiO₃ et le ZnO.

Conclusion

Nous avons pu voir ici comment on peut appliquer la technique HRS à des particules, afin d'en étudier les propriétés de GSH. Les protocoles de mesure que nous venons de détailler sont mis en pratique à l'aide d'un système expérimental de détection HRS, décrit dans la suite de ce chapitre. De même, la préparation des échantillons ainsi que les techniques de caractérisation utilisées afin de déterminer, entre autres, la taille et la concentration des particules, seront présentées par la suite.

III Système expérimental

Le système expérimental utilisé comporte un laser, un montage optique divisé en un banc d'excitation et un banc de détection, et un système électronique de détection et de traitement du signal. L'échantillon étudié est placé sur le montage optique à la jonction entre la zone d'excitation et la zone de détection.

III.1 Description du banc d'optique

Le banc optique est schématisé figure 2.9.

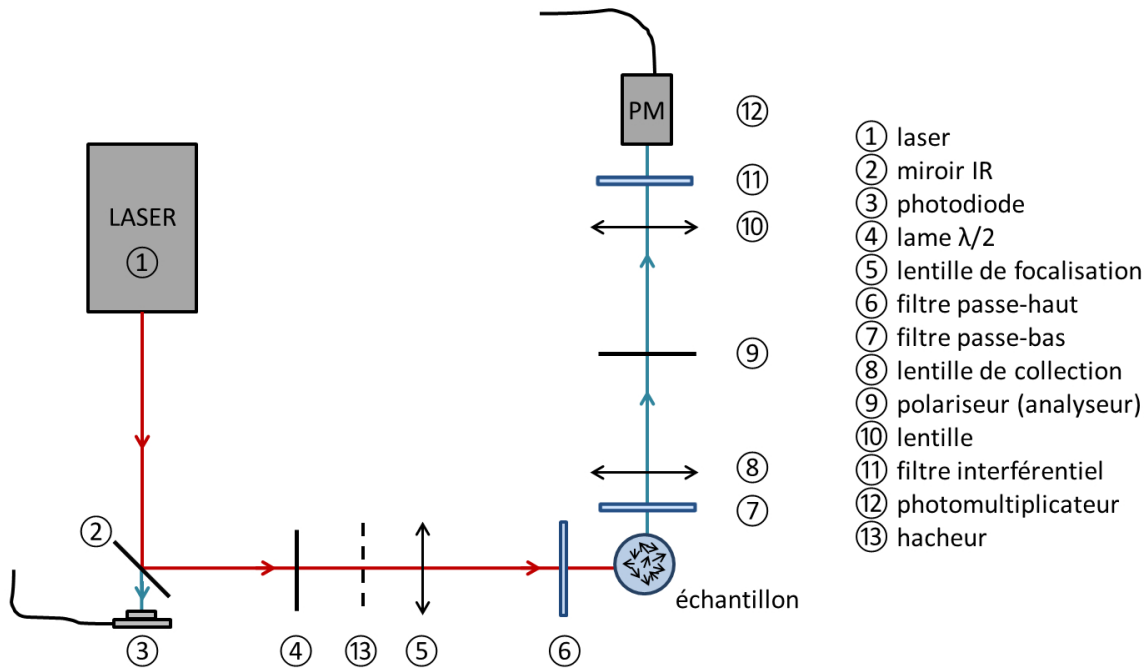


Figure 2.9 – Montage expérimental.

Le laser est un YAG à 1064 nm (Wedge HB, bright solutions) utilisé en mode pulsé à la fréquence de répétition de 1 kHz. La durée approximative d'un pulse est de 2 ns et la puissance maximale du laser est de 1 mJ par impulsion.

Le montage optique est constitué d'un miroir infra-rouge monté à 45° par rapport au faisceau. Ce miroir laisse passer un faisceau parasite à 532 nm provenant du laser, et détecté par une photodiode, qui émettra ainsi un signal de déclenchement synchronisé avec la pulsation du laser. Après le miroir, le faisceau à 1064 nm est focalisé sur l'échantillon grâce à une lentille de focale 20 cm. Un filtre passe-haut placé juste avant l'échantillon permet de filtrer les photons incidents à 532 nm. Une lame demi-onde est généralement ajoutée en amont de la lentille afin de faire varier la polarisation incidente. Le faisceau laser est polarisé initialement à l'horizontale.

Le banc de détection, situé après l'échantillon, se compose d'un filtre coloré passe-bas permettant de couper la diffusion du fondamental. Une lentille de focale 5 cm et de diamètre 2,54 cm collecte le signal de second harmonique puis une seconde lentille identique le focalise sur un photomultiplicateur (Hamamatsu H10721-210). Un filtre interférentiel à 532 nm est placé juste avant le photomultiplicateur (PM) afin de ne détecter que le signal de second harmonique. Un analyseur est généralement situé entre les deux lentilles afin de sélectionner la polarisation de détection.

III.2 Système de détection et d'acquisition

Le système d'acquisition est principalement constitué d'un boxcar (Stanford Research Systems), d'un oscilloscope (Tektronix), et d'une carte d'acquisition reliée au logiciel labVIEWTM. Le courant $I(t)$ émis par le PM représente donc le signal HRS au cours du temps. Ce courant n'est pas directement mesuré mais transformé en tension $U(t)$ par une résistance de 50 Ω , puis relié au boxcar.

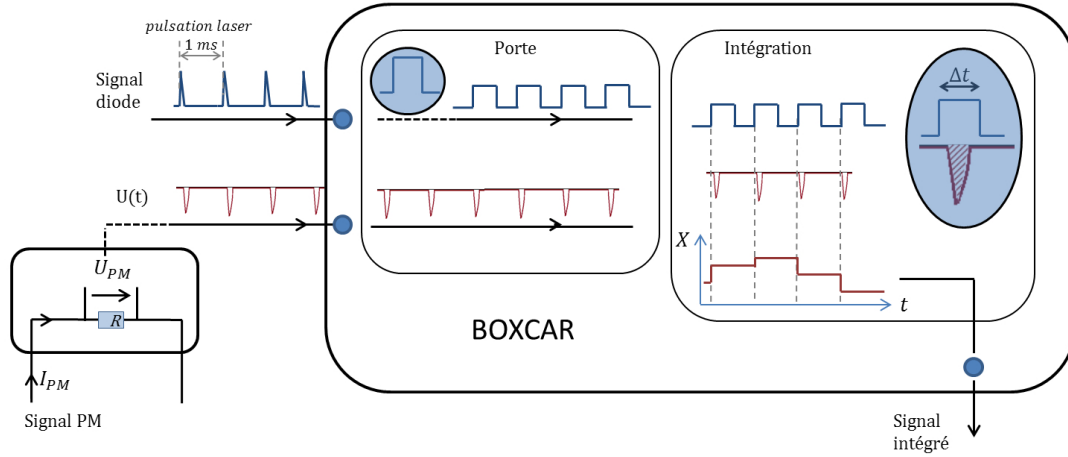


Figure 2.10 – Principe de la chaîne de détection et du Boxcar.

Le principe du traitement effectué par le boxcar est représenté sur la figure 2.10. Le boxcar acquière, en plus de la tension issue du PM, le signal de déclenchement émis par la photodiode. Un signal porte y est associé, dont la durée Δt peut être réglée par l'opérateur. Puisque le signal HRS est émis de manière instantanée à chaque impulsion laser, un pic de tension $U(t)$ (que l'on peut aussi observer sur l'oscilloscope) est intégré sur la durée Δt . Cette intégration correspond à la sommation de tous les photons reçus par le PM lors d'un pulse et caractérise effectivement l'intensité HRS détectée. La sortie du boxcar est une tension continue correspondant au signal intégré, qui est bloqué jusqu'au déclenchement suivant.

Ces valeurs de signal HRS intégré sont donc générées à la fréquence des impulsions laser, soit toutes les ms. Le signal est ensuite moyenné sur un nombre de pulses prédéfini, généralement 1000 ou 2000 (fig. 2.11). Pour une moyenne sur 1000 pulses par exemple, on obtient donc une valeur moyenne de signal HRS pour une acquisition de 1 seconde.

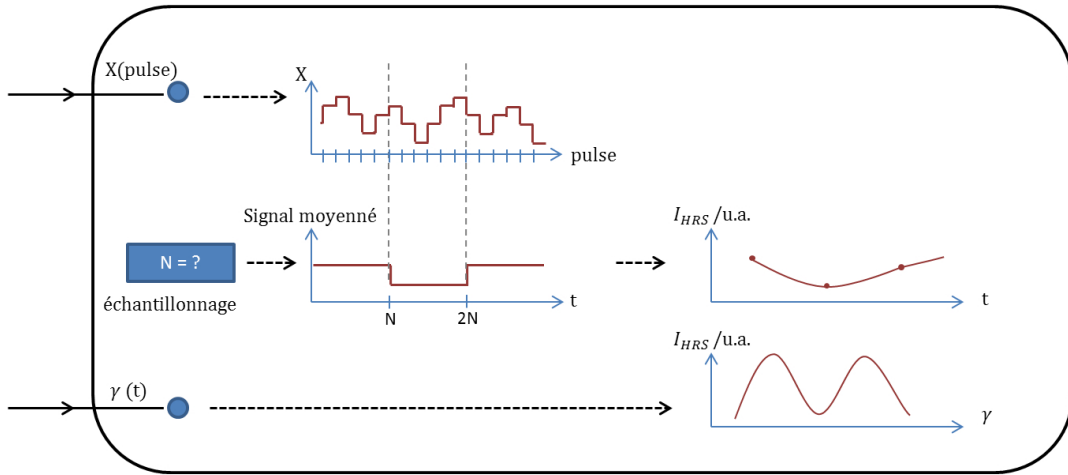


Figure 2.11 – Traitement du signal.

Le système d'acquisition permet également de réaliser des caractérisations plus poussées. La lame demi-onde est couplée à un moteur pour mesurer l'évolution du signal en fonction de la polarisation incidente.

Un dispositif utilisant un hacheur de signaux a aussi été mis en place dans le but d'augmenter le rapport signal/bruit. La motivation initiale de cette installation provient de la présence d'un offset électronique

dans le signal, peu stable dans le temps, et variant avec la sensibilité du boxcar. L'objectif visé est de réaliser une mesure supprimant automatiquement l'offset évitant ainsi de nombreux réglages manuels.

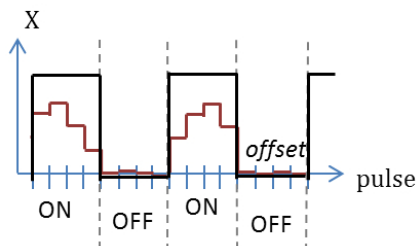


Figure 2.12 – Traitement du signal avec hacheur.

Le hacheur est placé dans le faisceau incident, ce qui induit une succession temporelle de modes ON (excitation laser de l'échantillon) et de modes OFF (faisceau coupé). Le signal HRS détecté est alors constitué alternativement de périodes "hautes" et de périodes "basses". Il est indispensable que la fréquence de hachage soit inférieure à la fréquence de pulsation laser pour éviter un recouvrement. Par exemple, pour une fréquence de hachage de 10 Hz, la fenêtre de hachage sera de 100 ms correspondant à 100 impulsions laser, ce qui est suffisant pour obtenir des valeurs moyennes. Le traitement logiciel calcule la moyenne séparément sur les valeurs hautes et les valeurs basses. Ces dernières correspondant à l'offset, il suffit de faire la différence entre les deux moyennes pour obtenir le signal HRS réel.

III.3 Limite expérimentale de détection

La limite de détection de ce système expérimental est difficile à déterminer car elle dépend de nombreux paramètres tels que les conditions expérimentales (bruit optique extérieur), les réglages optiques (en particulier l'angle solide de détection) ou la sensibilité des appareils de détection et de traitement du signal. Cependant, il peut être intéressant de déterminer quels sont les signaux les plus faibles qu'il est possible de détecter, afin de connaître le signal HRS de solvants et leur influence sur les mesures. Il semble également pertinent de s'intéresser à l'effet que peut avoir le mouvement naturel des particules en suspension en terme de bruit sur le signal HRS.

III.3.a Optique et détection

Le système optique est isolé de toute autre source de lumière que celle du laser. Cependant, des parasites peuvent subsister. Le traitement du signal au moyen du hacheur permet de corriger ces parasites. Par ailleurs, les réglages optiques sont effectués régulièrement afin de limiter les variations expérimentales. Des solutions moléculaires de para-nitroaniline sont utilisées afin de calibrer le système d'une mesure à l'autre. La puissance moyenne du laser est constante lors de la réalisation des mesures. Pour finir, les appareils optiques et de détection sont sélectionnés de manière à avoir la meilleure sensibilité aux longueurs d'onde correspondantes, soit 1064 nm pour l'excitation et 532 nm en détection.

III.3.b Signal HRS de référence

Les solvants utilisés, eau $\langle \beta_{eau} \rangle = 0,56 \cdot 10^{-30}$ esu, éthanol $\langle \beta_{ethanol} \rangle = 0,76 \cdot 10^{-30}$ esu et méthanol $\langle \beta_{methanol} \rangle = 1,46 \cdot 10^{-30}$ esu ont une réponse optique non linéaire qui est faible par rapport aux nanoparticules et difficilement détectable dans la configuration expérimentale standard. Par contre, une solution de pNA dilué dans du méthanol émet un signal facilement détecté par notre système expérimental, comme le montre la figure 2.13.

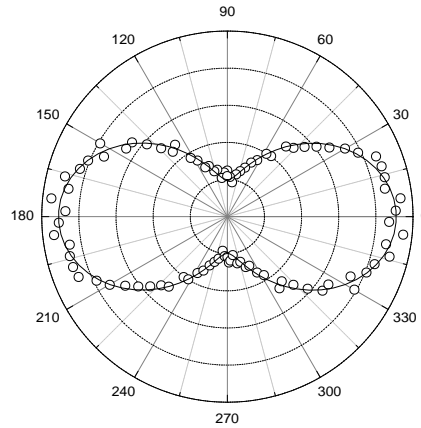


Figure 2.13 – Signal HRS d’une solution de pNA dans du méthanol à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

III.3.c Zone sondée par le laser

Les facteurs de variation externes tels que l’alignement du banc optique ne varient pas au cours d’une acquisition. Cependant, dans une suspension colloïdale, le mouvement des particules peut être à l’origine des fluctuations du signal optique. En effet, si le volume de suspension excité par le laser au point focal inclut une faible quantité de particules, le signal HRS émis par celles-ci varie fortement en fonction de leur mouvement dans et hors de cette zone d’excitation [Duboisset 09]. Sur la figure 2.14, on peut voir par exemple le signal HRS en fonction de la polarisation pour deux suspensions de KNbO_3 . La première, relativement concentrée présente un signal stable tandis que la deuxième, diluée 50 fois, présente des fluctuations beaucoup plus importantes par rapport au signal moyen, fluctuations qui ne sont pas liées au système expérimental mais à l’échantillon.

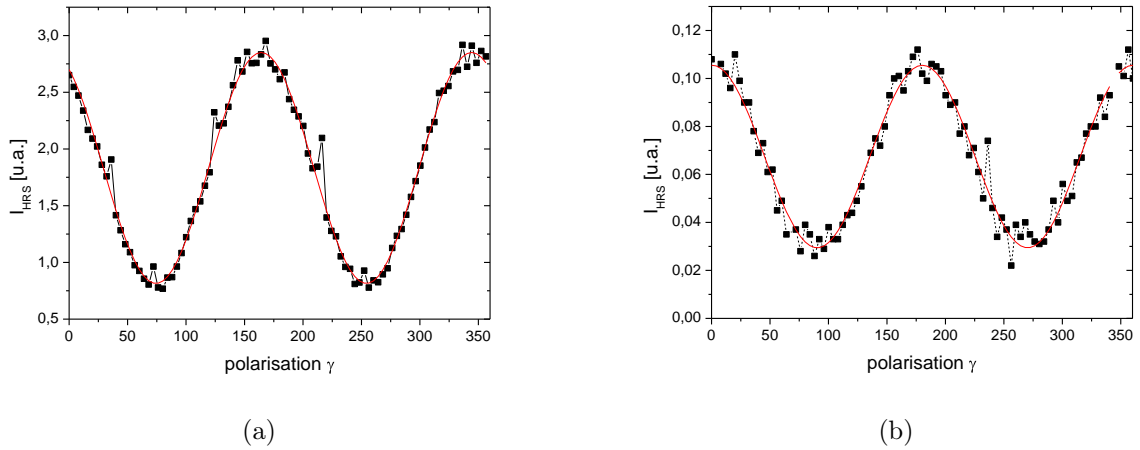


Figure 2.14 – Signal HRS de suspensions de KNbO_3 (nombre de points moyennés = 1000) : (a) suspension initiale $N \sim 2.10^{10} \text{ cm}^{-3}$ et (b) même suspension diluée 50 fois $N \sim 4.10^8 \text{ cm}^{-3}$.

On cherche ici à définir le seuil en concentration pour lequel les fluctuations deviennent suffisamment faibles pour ne pas dénaturer le signal et rendre possible son exploitation. En s’appuyant sur les caractéristiques du laser et du montage optique, on définit, au point focal, le volume sondé par le laser, c’est-à-dire le volume dans lequel on considère la puissance laser suffisante pour générer du second harmonique. En

se référant à l'annexe A, on trouve un volume d'excitation tel que $7,8 \cdot 10^{-5} < V_{exc} < 9,6 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$. La figure 2.15 illustre le nombre de particules sondées dans ce volume en fonction de la concentration N [m^{-3}] des suspensions. Les deux bornes *min* et *max* font référence aux deux volumes d'excitation inférieur et supérieur définis précédemment.

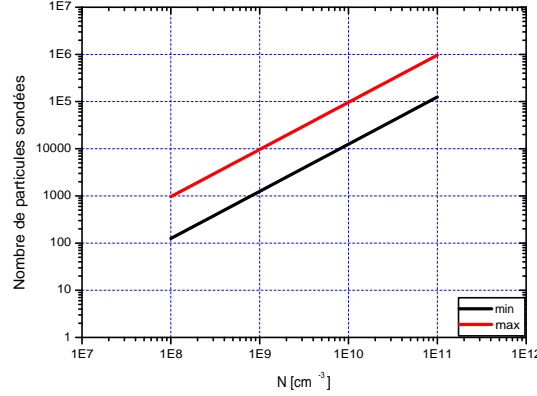


Figure 2.15 – Nombre de particules sondées en fonction de la concentration de la suspension.

On constate d'après ces deux graphes, que pour les concentrations habituellement utilisées, entre 10^8 et 10^{11} particules/ cm^3 , le signal HRS détecté est issu d'une moyenne statistique de 100 à 10^6 particules. On peut donc considérer cette limite comme acceptable. On note cependant que pour une concentration de 10^8 particules/ cm^3 , le nombre statistique de particules excitées est compris entre 100 et 1000, ce qui fait que le mouvement brownien des particules peut entraîner une variation du nombre de particules excitées et donc des fluctuations de signal observables (fig. 2.14). Cela implique un bruit sur le signal qui complique l'analyse des données. Il est donc préférable de travailler avec des concentrations de l'ordre de 10^9 particules/ cm^3 et plus.

III.3.d Estimation de la limite de détection pour des suspensions

Nous cherchons à déterminer la limite de détection pour des suspensions de nanoparticules, c'est-à-dire quelle sont les taille et concentration limites de ces suspensions pour une acquisition de qualité acceptable. Pour cela, on utilise la réponse HRS d'un échantillon de cristaux de KNbO_3 que l'on étudiera au chapitre 3, de concentration $N=2,04 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ et de diamètre $D=128 \text{ nm}$. On rappelle que :

$$I_{HRS} \propto NV^2 < d^2 > \quad (2.43)$$

au vu de la valeur du signal, on estime, pour cet échantillon, que la limite de détection est atteinte si l'on divise le signal par un facteur 100.

Pour un échantillon de particules de même taille, la limite est donc atteinte pour une concentration 100 fois plus faible, c'est-à-dire de l'ordre de $2 \cdot 10^8$ particules. cm^{-3} . Comme on vient de le voir, cela correspond également à une concentration pour laquelle les fluctuations du signal commencent à être relativement importantes par rapport au signal lui-même.

On considère maintenant une concentration d'environ $2 \cdot 10^{10}$ particules. cm^{-3} et l'on cherche à déterminer la taille minimale des cristaux. On a, d'après l'équation précédente, $I_{HRS} \propto D^6$. Pour un signal 100 fois inférieur au signal détecté précédemment, cela correspond à une taille équivalente à $D/2,15$, soit environ 60 nm de diamètre. Cela signifie que si l'on souhaite travailler avec des particules de petite taille, inférieures à 50 nm, il est nécessaire de préparer des suspensions de concentration plus élevée. La comparaison avec d'autres types de particules donne les mêmes ordres de grandeur pour ces limites en taille et en concentration, excepté pour le BFO, matériau dont on reparlera au chapitre 5.

Conclusion

Dans cette partie, le système de détection et d'acquisition a été présenté. Nous avons pu voir également que ce système expérimental est suffisamment sensible pour détecter les réponses ONL de solutions moléculaires de pNA dilué dans du méthanol. Nous avons également déterminé les concentrations et tailles minimales de suspensions de particules, pour lesquelles le signal est suffisamment stable et intense pour être détecté dans de bonnes conditions.

IV Préparation et caractérisation de suspensions de nanocristaux

Les échantillons observés en HRS sont le plus souvent sous la forme de suspensions colloïdales, c'est-à-dire de nanoparticules en suspension dans un solvant. Leurs caractéristiques sont importantes pour une étude rigoureuse du signal HRS, c'est pourquoi il est nécessaire de connaître les méthodes de préparation et les techniques de caractérisation employées. En effet, comme on l'a vu précédemment, le signal HRS dépend de la concentration des molécules. Il en va de même avec les particules. Leur concentration est donc essentielle à connaître. Nous verrons également par la suite que la taille des particules est un paramètre important pour l'analyse du signal HRS, et que la stabilité des suspension favorise la précision des mesures.

IV.1 Préparation de suspensions colloïdales

La méthode de préparation utilisée a pour objectif d'obtenir, à partir de poudres sèches, des suspensions les plus stables et les moins polydisperses possibles. La figure 2.16 décrit cette méthode de préparation.

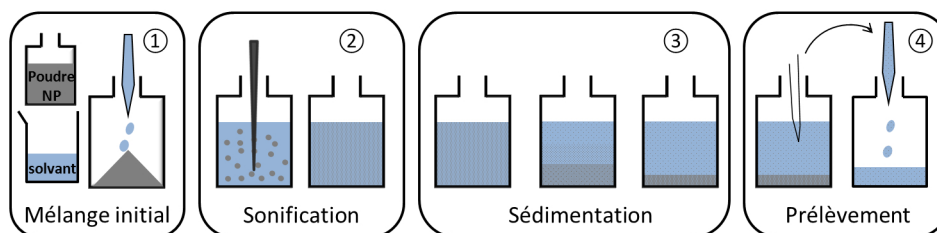


Figure 2.16 – Préparation des suspensions colloïdales.

Dans un premier temps, une solution mère est préparée par mélange de poudres sèches agglomérées dans un solvant pour une concentration d'environ 0,5 mg/mL. Le solvant est généralement l'eau, reproduisant les milieux biologiques, mais l'éthanol est également utilisé car certaines particules sont plus stables dans ce solvant, ce qui rend l'étude expérimentale plus facile.

La solution mère ainsi obtenue est généralement constituée de nombreux agglomérats de particules. La désagrégation est réalisée au moyen d'ultrasons en utilisant une sonotrode, Autotune 750W, vibra cell 75043 (Bioblock Scientific), typiquement pendant 25 min à 40% en mode pulsé (1s on, 4s off) à température ambiante. Les particules sont ainsi séparées les unes des autres et leur taille moyenne observée diminue.

Ensuite, l'élimination des agrégats restants et des particules les plus grosses s'effectue par sédimentation. Les solutions sont laissées au repos pendant une durée variant de 1 à 7 jours selon le type de particules.

Pour finir, la récupération du surnageant permet d'obtenir une suspension stable constituée de particules les plus fines. Cette étape doit être réalisée avec précaution afin de ne pas remuer le dépôt. Les concentrations des surnageants sont de l'ordre de 0,1 mg/mL.

Nous verrons par la suite que certaines mesures optiques nécessitent l'analyse de suspensions colloïdales de différentes concentrations. Dans ce cas, des dilutions sont effectuées à partir d'un même surnageant, ce qui permet d'obtenir des suspensions dont les concentrations peuvent être comparées de manière précise.



Figure 2.17 – Suspensions colloïdales de BFO de différentes concentrations obtenues à partir d’un même surnageant.

IV.2 Caractérisations des suspensions

Les caractérisations des suspensions ont pour objectif de déterminer les particularités des échantillons ayant une influence sur le signal HRS. Les principaux paramètres à connaître sont la taille des nanoparticules et la concentration des suspensions. La stabilité des colloïdes est également un facteur pouvant influencer et fausser la mesure. Par ailleurs, il est généralement souhaitable de connaître l’aspect des cristaux afin de connaître leur forme d’une part et s’ils sont peu ou pas agrégées d’autre part. Pour finir, bien qu’en général la nature cristalline des poudres est connue avant la préparation des suspensions colloïdales, il peut être intéressant dans certains cas de s’assurer de la cristallinité des particules présentes en suspension. Une succincte description des techniques utilisées pour ces caractérisations est présentée ici.

IV.2.a Taille des nanoparticules

La taille des particules est mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS, acronyme anglais pour Dynamic Light Scattering). Cette technique permet de déterminer le diamètre hydrodynamique d’objets en solution grâce à une méthode optique. L’appareil utilisé est un zetasizer NanoZS (Malvern Instruments).

La DLS étudie la lumière diffusée par des particules en suspension, issue d’une illumination laser. Généralement détectée à 90° ou 173° , la lumière diffusée présente des fluctuations d’intensité liées au mouvement brownien des particules. Ce mouvement brownien est régit par l’équation de Stokes-Einstein selon laquelle la vitesse de déplacement dépend de la taille des particules : les petites particules ont un mouvement rapide tandis que les grosses particules ont un mouvement lent. Ainsi, les fluctuations dues à la présence de petites particules sont très rapides et de faible intensité, alors que les fluctuations liées aux grosses particules sont lentes et de plus forte intensité. Ces fluctuations sont caractérisées par la corrélation entre un instant t et un instant $t + \delta t$. La corrélation va être d’autant plus élevée que la durée δt sera courte et va ensuite diminuer avec le temps. Lorsque les objets diffusant sont petits, on a vu que les fluctuations sont rapides donc la corrélation du signal diminue rapidement au cours du temps ; lorsqu’ils sont gros, la corrélation diminue plus lentement. L’étude de ce signal de corrélation permet donc de retrouver la distribution en taille des particules présentes en suspension.

Pour bien comprendre les résultats donnés par la DLS, il est nécessaire de savoir que la distribution en taille est calculée à partir de la corrélation du signal en intensité. Or, pour des objets relativement petits de dimension D (régime Rayleigh), l’intensité diffusée par une particule est proportionnelle à D^6 . Le signal diffusé par de grosses particules est ainsi beaucoup plus intense que celui issu de petites particules. Un échantillon de polydispersité élevée, contenant des particules de tailles diverses, ne peut donc pas être caractérisé précisément, puisque la présence de petites particules est masquée par les grosses.

De plus, cette technique mesure la taille hydrodynamique correspondant à une sphère de motif de diffusion équivalent, prenant en compte sa couche d’hydratation, c’est-à-dire le volume déplacé par la particule lors de son mouvement dans le liquide.

Une mesure permet donc de déterminer une distribution en intensité des particules (intensité diffusée

en fonction de la taille des particules). La distribution en volume est ensuite calculée en faisant appel à la théorie de Mie, à l'aide de l'indice de réfraction de la particule. À partir de cette distribution, le logiciel calcule enfin la distribution en nombre. Les objets caractérisés étant assimilés à des sphères, cette technique n'est pas vraiment adaptée à des objets de forme anisotrope tels que des bâtonnets ou aiguilles.

Dans la suite de ce travail, on utilisera les distributions de taille en nombre et en intensité. Les diamètres moyens de chacune de ces distributions seront alors notés D_{Nb} et D_{Int} respectivement.

Par ailleurs, les agrégats de particules sont identifiés comme de grosses particules, puisque leur diamètre hydrodynamique est important. Enfin, si la taille hydrodynamique mesurée permet de définir approximativement la taille réelle de la particule pour des diamètres $D > 10$ nm, le volume de liquide déplacé avec la particule n'est plus négligeable pour des objets plus petits. Cela entraîne une sur-estimation de la taille lorsque les particules sont très petites. Des caractérisations complémentaires sont donc parfois nécessaires afin d'identifier la taille réelle des nanocristaux individuels, comme la diffraction des rayons X et la microscopie électronique à balayage ou à transmission.

IV.2.b Diffraction des Rayons X (DRX)

La DRX est réalisée sur des poudres sèches. Elle est principalement utilisée pour identifier la structure cristalline des particules. Son utilisation est également envisagée comme complément à la DLS lorsque les particules sont très petites ou lorsqu'elles sont constituées de petites cristallites agglomérées. On utilise dans ce cas la formule de Scherrer permettant d'estimer la taille des cristallites à partir de la largeur des pics de diffraction.

IV.2.c Forme et aspect des nanoparticules

La seule manière d'avoir une idée concrète de l'aspect des particules est de les observer au microscope électronique. Pour observer les particules issues des suspensions colloïdales, il ne faut pas travailler à partir des poudres sèches initiales. Le protocole utilisé consiste à centrifuger les suspensions afin de les re-concentrer puis à déposer une goutte de solution ainsi obtenue sur un support adéquat à la technique d'observation. Ce dépôt doit succéder à la centrifugation dans un court délai pour éviter les phénomènes d'agrégation amplifiés par l'augmentation de la concentration. Les systèmes microscopiques utilisés sont le microscope électronique à balayage (MEB), présent au laboratoire SYMME, et le microscope électronique à transmission (MET), disponible chez des partenaires du projet.

IV.2.d Concentration des suspensions

La concentration des suspensions est difficile à déterminer dans la mesure où elle ne peut pas être connue lors de leur préparation, puisqu'on travaille sur des surnageants. La méthode utilisée, décrite ci-dessous, consiste à effectuer une détermination par pesée après évaporation.

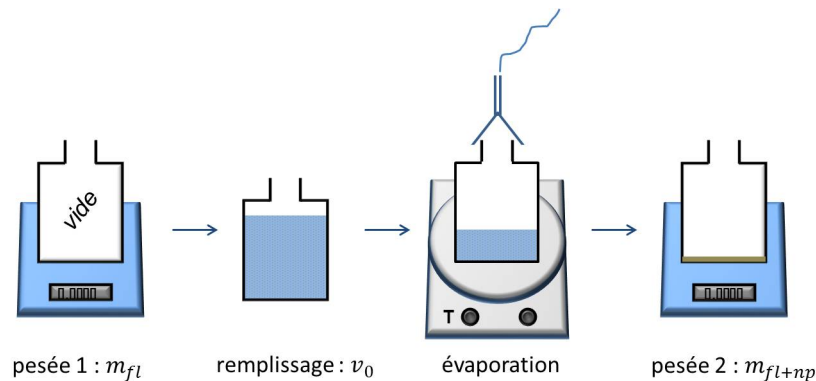


Figure 2.18 – Mesure de concentration par pesée.

Dans un premier temps, le flacon destiné à la mesure est pesé vide. Il est nécessaire de s'assurer de l'extrême propreté de ce flacon afin de limiter les incertitudes de mesure. Le flacon est ensuite rempli d'un volume précis du surnageant à caractériser, puis déposé sur une plaque chauffante afin que le solvant s'évapore. Lors du chauffage, un capuchon est déposé par-dessus l'échantillon afin de permettre l'évaporation tout en évitant que des particules de la suspension se volatilisent. Après évaporation du solvant, le flacon est à nouveau pesé, incluant cette fois la poudre de nanocristaux issues de la suspension. On peut ainsi déterminer la concentration massique de la suspension :

$$C_0 = \frac{m_{fl+nc} - m_{fl}}{v_0} \quad (2.44)$$

$$avec \begin{cases} m_{fl} \text{ la masse du flacon vide} \\ m_{fl+nc} \text{ la masse du flacon après évaporation incluant la masse des nanocristaux} \\ v_0 \text{ le volume de suspension prélevé avant évaporation.} \end{cases}$$

Pour connaître la concentration N en nombre de particules par volume de suspension, il suffit de connaître la masse volumique du matériau dont sont constituées ces particules ainsi que leur volume. Celui-ci est estimé à partir de la taille des particules donnée en DLS et en considérant des particules sphériques.

$$N = \frac{C_0}{\rho V} \quad avec \begin{cases} \rho \text{ la masse volumique du matériau} \\ V \text{ le volume moyen des nanoparticules.} \end{cases} \quad (2.45)$$

IV.2.e Stabilité des suspensions

La stabilité des suspensions colloïdales est un paramètre important pour la fiabilité des mesures HRS. En effet, si les particules ne sont pas stables, elles s'agregent et vont avoir tendance à sédimenter. La concentration réelle de la suspension diminue alors, ce qui entraîne une diminution du signal HRS difficile à quantifier.

La technique de préparation des suspensions colloïdales par sédimentation, présentée précédemment, permet d'obtenir les meilleurs résultats en terme de stabilité puisque l'on conserve naturellement les particules les plus stables. Comme chaque suspension est différente par la nature du matériau, la nature du solvant et éventuellement la forme des particules, il est intéressant d'observer le comportement des suspensions lors de la sédimentation, afin de déterminer quel est le moment optimal pour prélever le surnageant, c'est-à-dire avec une dispersion en taille la plus faible possible, une stabilité la plus élevée possible et une concentration suffisamment élevée pour être aisément détectée en HRS. Pour cela, des mesures DLS réalisées au cours du temps permettent de connaître l'évolution de la distribution en taille des particules présentes dans le surnageant.

Un autre type de mesure, le potentiel zêta, est utilisé afin de déterminer directement la stabilité des particules dans l'eau. Il est basé sur le principe selon lequel une particule en solution présente des charges de surface. Par interaction électrostatique avec ces charges de surface, des ions du liquide viennent former des couches chargées autour de la particule, se répartissant en deux zones distinctes. Premièrement, la couche de Stern, couche dense et liée à la particule, dans laquelle des ions viennent s'adsorber à la surface de la particule. Et deuxièmement, la couche de Gouy, plus diffuse et non liée. Entre ces deux couches se trouve un plan de cisaillement hydrodynamique, facilement détectable par des mesures de mobilité électrophorétique des colloïdes. Le potentiel zêta, calculé à partir de ces mesures, correspond à la différence de potentiel entre ce plan et le liquide. Un potentiel zêta faible en valeur absolue et compris entre -30 mV $< \zeta < 30$ mV indique une mauvaise stabilité des suspensions tandis qu'une suspension stable a un potentiel zêta tel que $|\zeta| \geq 30$ mV. L'appareil utilisé pour ces mesures est le même qu'en DLS.

IV.3 Préparation d'une solution de para-nitroaniline

Le para-nitroaniline (pNA) est une molécule de formule $C_6H_6N_2O_2$ dont les propriétés ONL sont bien connues. Elle est utilisée comme référence afin de calibrer le système expérimental. La mesure HRS s'effectue dans ce cas sur une solution moléculaire de pNA dans du méthanol.

La préparation de la solution moléculaire consiste à diluer du pNA sous forme de poudre sèche cristallisée (Sigma-Aldrich, 185310, $\geq 99\%$) dans du méthanol, puis à laisser sous agitation magnétique pendant environ 12h.

La solution doit être réalisée de manière à connaître précisément la concentration, donnée nécessaire pour des mesures quantitatives en HRS. Plusieurs précautions sont à prendre à ce niveau. On constate par exemple un palier du signal HRS en fonction de la concentration, lié à la limite de solubilité du pNA dans le méthanol (fig. 2.19).

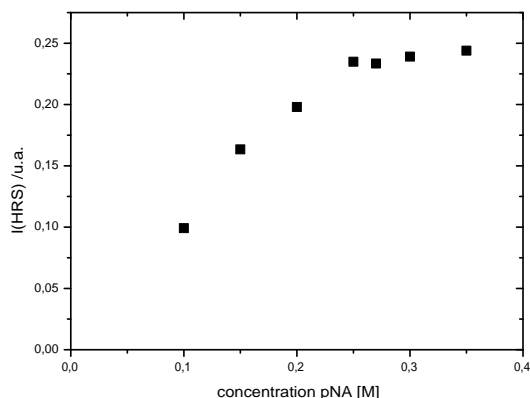


Figure 2.19 – Seuil de solubilité du pNA

De plus, la poudre cristallisée doit être la plus pure possible ($\geq 99\%$) afin d'éviter des erreurs sur la concentration ainsi que la présence d'agglomérats dans la solution. Ces agglomérats peuvent être détectés au moyen d'une mesure DLS. Enfin, le vieillissement de la poudre peut également modifier la solubilité et donc la concentration réelle de la solution.

A partir de la solution initiale, des solutions filles sont obtenues par dilution afin d'obtenir des échantillons à différentes concentrations. Comme sur la figure 2.19, cet échantillon de solutions est ensuite testé en HRS afin de conserver seulement ceux pour lesquels le signal HRS est réellement proportionnel à la concentration.

Pour éviter une dégradation des suspensions due au vieillissement (évaporation, cristallisation, etc), une nouvelle solution de pNA est préparée tous les 18 mois.

V Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le principe de la technique HRS ainsi que les méthodes utilisées pour l'appliquer à la caractérisation de nanoparticules. Nous allons montrer par la suite la réalisation des mesures effectuées selon les protocoles exposés ici. Dans le chapitre 3, nous nous intéresserons à la mise en oeuvre de la méthode par référence externe, dans le but de déterminer les coefficients moyens des nanoparticules étudiées. Le chapitre 4 traitera des mesures résolues en polarisation et de l'obtention des coefficients indépendants des tenseurs d'hyperpolarisabilité de ces matériaux.

Efficacités optiques moyennes des nanocristaux

Introduction

La technique de diffusion Hyper-Rayleigh (HRS) présentée au chapitre 2 permet de déterminer, grâce à des mesures d'ensemble, les coefficients ONL moyens de second ordre sur des nanoparticules. Des mesures comparatives réalisées selon la méthode de la référence externe permettent ainsi d'évaluer quantitativement les propriétés de GSH de nano-marqueurs optiques potentiels tels que BaTiO_3 , ZnO , KNbO_3 , KTP et LiNbO_3 .

Dans le contexte des projets Naomi et Namdiatream, ces propriétés sont particulièrement intéressantes à évaluer afin de pouvoir sélectionner le ou les marqueurs biologiques les plus efficaces optiquement. En effet, les particules de forte efficacité optique permettent d'imager dans de meilleures conditions en termes de contraste optique et de temps d'acquisition. Cela favorise également l'utilisation de marqueurs de plus petite taille, ce qui est avantageux pour certaines applications à l'échelle biologique.

Dans ce chapitre, des mesures expérimentales effectuées sur différents types de nanoparticules sont présentées. Après une brève description des particules étudiées, on détaillera un exemple de détermination de coefficients moyens pour des nanocristaux de KNbO_3 . Dans l'objectif d'évaluer la précision de la mesure, les différentes sources d'erreurs ainsi que les difficultés expérimentales rencontrées seront ensuite analysées. Les résultats obtenus pour chaque type de particule seront finalement présentés.

I Présentation des différentes particules

Dans cette partie, nous présentons les différentes nanoparticules étudiées dans ce travail. Pour chaque type de matériau, une courte description physique est proposée, incluant la structure cristallographique, ainsi que les propriétés physiques les plus exploitées à l'heure actuelle. Ensuite, les techniques de synthèse utilisées pour l'obtention des poudres sont présentées ainsi que les caractéristiques principales de ces poudres en suspension : stabilité et temps de sédimentation.

Un des principaux intérêts de ce travail est de pouvoir effectuer une comparaison directe des efficacités de GSH de différentes particules potentiellement avantageuses pour l'imagerie biologique, et ce, grâce à l'utilisation des mêmes outils et protocoles de mesures. Dans ce cadre, les différents matériaux ont été réunis, grâce notamment aux différents partenaires du projet tels que la société FEE mais également d'autres partenaires comme le laboratoire SRSMC de Nancy.

I.1 BaTiO_3

Le Titanate de Barium est un matériau de la famille des perovskites dont la phase à température ambiante ($8^\circ\text{C} < T < 125^\circ\text{C}$) est de structure tétragonale et de groupe ponctuel 4mm. Cette phase est également ferroélectrique [Wang 10]. Le BaTiO_3 a une masse volumique de $\rho = 6,02 \text{ g.cm}^{-3}$ et est

insoluble dans l'eau. Au-delà de sa température de Curie à 125°C, la structure du matériau devient cubique et paraélectrique.

En raison de ses diverses propriétés, les applications de ce matériau sont nombreuses, que ce soit sous forme de céramique ou de couches minces. Il est par exemple utilisé pour la réalisation de condensateurs multi-couches en raison de sa constante diélectrique élevée, ses propriétés piezoélectriques permettent de l'employer pour des transducteurs et il entre dans la réalisation de thermistances grâce à son coefficient de température positif. Ses propriétés optiques sont également mises à profit dans la réalisation de dispositifs optiques et électro-optiques tels que des modulateurs électro-optiques [Maison 03]. L'utilisation de BaTiO₃ sous forme de nanoparticules de haute qualité cristalline a d'abord été motivée par l'industrie électronique dans l'objectif de toujours réduire les dimensions des composants [Huang 06].

Les méthodes d'élaboration de ces nanoparticules sont variées, comme on a pu le voir au chapitre 1. Dans notre projet, les nanoparticules de BaTiO₃ sont fournies par la société FEE GmbH (Idar-Oberstein, Allemagne). Ces poudres sont obtenues par broyage de restes de cristaux massifs, dans un premier temps à la main avec pilon et mortier en carbure de bore, puis de manière automatisée dans une cuve de broyage en nitrure de silicium. Lors de la préparation, le temps de sédimentation pour ces particules est d'environ une journée. Les suspensions ainsi obtenues ont une mauvaise stabilité dans l'eau et le potentiel zêta n'a pas pu être mesuré à pH neutre, mais donne une valeur de 20 mV à pH=3. La stabilité des suspensions est améliorée lorsque le solvant choisi est l'éthanol.

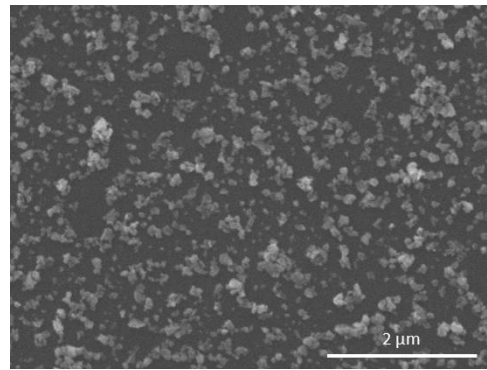


Figure 3.1 – Image MEB de nanoparticules de BaTiO₃.

Les propriétés optiques non linéaires de BaTiO₃ et des autres matériaux décrits par la suite sont répertoriées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 – Coefficients optiques non linéaires indépendants du tenseur d'hyperpolarisabilité des différents matériaux dans les conditions de Kleinman. *Extrait de [Nikogosyan 05, Shoji 97, Wang 01, Volk 09]*

d_{ij} [pm/V]	BaTiO ₃	KNbO ₃	KTP	LiNbO ₃	ZnO
d_{31}	14	10,8	3,7	-5,95	0,7
d_{33}	5,5	19,6	14,6	-34,4	-7,3
d_{32}	/	10,8	2,2	/	/
d_{22}	/	/	/	3,07	/

I.2 KNbO₃

Le niobate de potassium est une perovskite ferroélectrique très employée pour ses propriétés optiques non linéaires. En tant que cristal massif, il sert par exemple à la réalisation d'oscillateurs paramétriques optiques (OPO). Sa structure cristalline est de type orthorhombique entre -50°C et 222°C et de groupe

ponctuel mm². Cette phase est conservée pour des particules de taille inférieure à 50 nm [Chen 11]. Au-delà de 418°C, correspondant à la transition entre la structure tetragonale et cubique, ce matériau devient paraélectrique.

Les cristaux étudiés dans le cadre de ce travail sont fournis par FEE et obtenus par broyage selon le même mode opératoire que pour le BaTiO₃. L'étape de sédimentation avant récupération du surnageant est de 7 jours pour les suspensions de particules de KNbO₃ dans l'eau. Les suspensions ainsi obtenues sont très stables, avec une valeur typique de potentiel zêta d'environ -43 mV à pH=7.

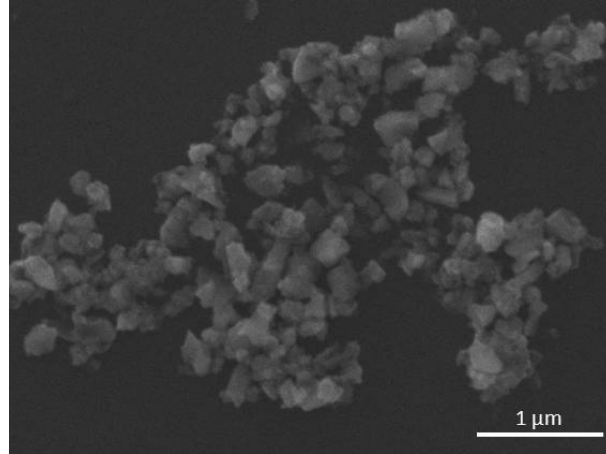


Figure 3.2 – Image MEB de nanoparticules de KNbO₃.

I.3 KTP

Le phosphate de potassium tytanil, KTiOPO₄, est particulièrement connu pour ses propriétés optiques non linéaires et sa bonne stabilité thermique. A l'instar du KNbO₃, il est fréquemment utilisé pour la fabrication d'OPO, mais également de guides d'ondes doubleurs de fréquence. Sa structure cristalline est de type orthorhombique de groupe ponctuel mm² [Bierlein 89]. Son comportement ferroélectrique est observé en-dessous de $T_C=934^\circ\text{C}$ [Yanovskii 86].

Les poudres utilisées dans le cadre de ce projet sont issues des restes de croissance de cristaux massifs et fournies par la société Cristal Laser (Messein, France). Ces nanocristaux de KTP en suspension dans l'eau nécessitent un temps de décantation de 2 jours pour un filtrage optimal. Ils sont relativement gros et leur forme est anisotrope. La stabilité des suspensions est mauvaise dans l'eau puisque le potentiel zêta est au maximum de -25 mV à pH=7.

I.4 LiNbO₃

Le niobate de lithium est un matériau ferroélectrique de structure trigonale, de groupe d'espace R3c et de groupe ponctuel 3m [Weis 85]. Ses nombreuses applications sont principalement basées sur ses propriétés optiques et piezoélectriques : guides d'onde, modulateurs optiques, capteurs piezoélectriques, etc.

Les nanocristaux étudiés ici proviennent d'un laboratoire partenaire, le SRS MC (Nancy, France) où ils sont synthétisés par voie chimique (réduction de sels de niobium suivi d'une hydrolyse [Aufray 09]) avant de subir un recuit nécessaire à leur cristallisation. Un broyage au mortier est généralement effectué ensuite de manière à réduire la taille des agglomérats éventuels. Les suspensions aqueuses de LiNbO₃/eau nécessitent un temps de sédimentation de 7 jours avant récupération du surnageant. Ces suspensions sont stables avec un potentiel zêta de -44 mV à pH neutre.

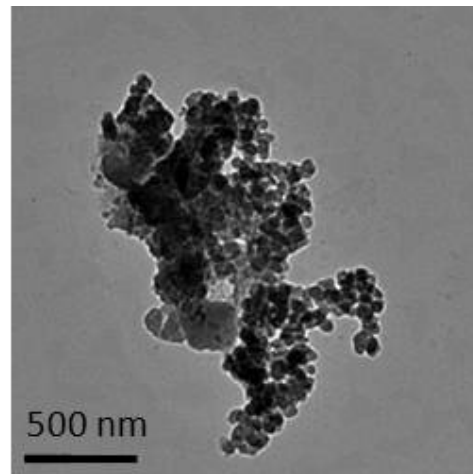


Figure 3.3 – Image MET de nanoparticules de KTP.

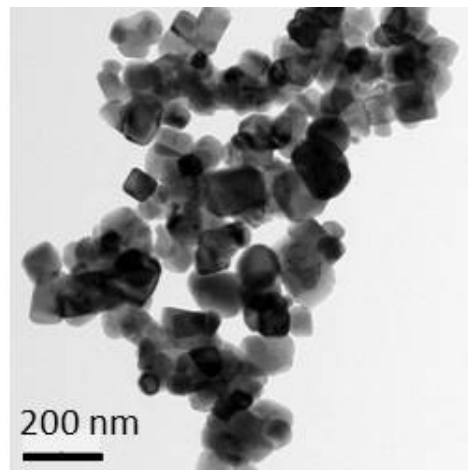


Figure 3.4 – Image MET de nanoparticules de LiNbO₃.

I.5 ZnO

L'oxyde de zinc est un matériau dont la structure est hexagonale de type Wurtzite et de groupe ponctuel 6mm [Klingshirn 07]. Contrairement aux matériaux précédemment présentés, le ZnO n'est pas ferroélectrique. En revanche, il appartient à la famille des semi-conducteurs II-VI, dont la bande d'énergie interdite est de 3,4 eV (correspondant à une longueur d'onde de 365 nm). Il est très utilisé en optoélectronique ainsi que pour ses propriétés pyroélectriques. Sous formes de nanoparticules, son usage est de plus en plus répandu dans le domaine des cosmétiques.

Au laboratoire, les poudres de ZnO ont été achetées à la société NanoAmor (Houston, Etats-Unis). Le temps de sédimentation pour les suspensions ZnO/eau est de 7 jours. Avec un potentiel zêta de 28 mV à pH neutre, la stabilité des nanoparticules dans l'eau est mauvaise. Cependant les suspensions de ZnO dans l'éthanol sont nettement plus stables et sont donc préférables pour les analyses optiques. Par ailleurs, deux types de poudres de ZnO sont analysées. L'une comporte des particules de taille commerciale 90-200 nm (fig. 3.5) et l'autre de taille 20 nm. Pour ces dernières, la taille mesurée en DLS et par diffraction de rayons X est plutôt de l'ordre de 50 nm [Le Dantec 11].

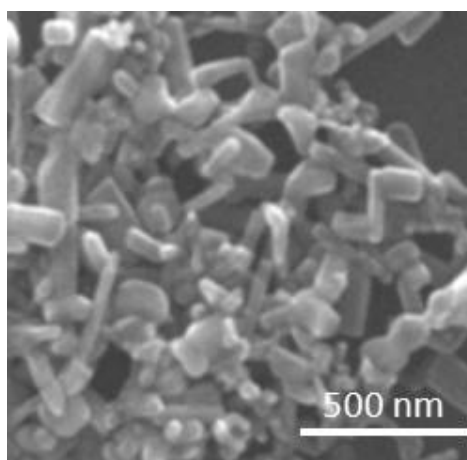


Figure 3.5 – Image MEB de nanoparticules de ZnO 90-200 nm.

Conclusion

Ces différentes nanoparticules de structure cristalline non-centrosymétrique sont pour la plupart ferroélectriques, à l'exception du ZnO. Ce dernier est le seul semi-conducteur, mais reste transparent aux longueurs d'ondes de 1064 nm et 532 nm utilisées dans ce travail. Tous les autres sont également transparents dans cette gamme de longueur d'onde et ne présentent donc pas d'absorption. Les poudres ici décrites sont toutes de couleur blanche et les suspensions obtenues sont plutôt translucides, particulièrement lorsqu'elles sont très concentrées. On a pu voir que certains matériaux, tels que le KNbO_3 et le LiNbO_3 , sont très stables dans l'eau, ce qui améliore les caractérisations optiques et DLS. Les autres particules sont généralement étudiées dans l'éthanol.

Toutes ces nanocristaux ont donc été étudiés optiquement de manière à retrouver leurs coefficients non linéaires moyens. Nous allons maintenant présenter plus en détail cette approche en se basant sur un exemple, celui de KNbO_3 .

II Exemple détaillé des nanocristaux de KNbO_3

Les particules de KNbO_3 présentent un intérêt particulier puisque leur toxicité est faible comme on a pu l'observer dans le chapitre 1 et que les suspensions de KNbO_3 dans l'eau sont stables, ce qui facilite nettement les caractérisations.

A partir de la démarche expérimentale présentée au paragraphe II.2 du chapitre 2, nous décrivons ici les mesures effectuées et l'analyse consécutive permettant de déterminer les coefficients ONL moyens de ces nanocristaux.

II.1 Préparation des échantillons et mesure de taille

Les suspensions colloïdales sont préparées selon le protocole précédemment décrit, en dispersant des poudres de KNbO_3 dans de l'eau. Cette préparation inclut les étapes de désagrégation par ultrasonification et de sédimentation. Après récupération du surnageant, la taille des nanoparticules en suspension est mesurée par DLS. Trois mesures successives sont réalisées sur un même échantillon. La variabilité d'une mesure à l'autre est généralement due à une faible stabilité de la suspension, à une dispersion en taille élevée ou à une faible concentration. La suspension n'est utilisée que si les trois mesures sont similaires. Nous prenons alors en considération la moyenne des trois résultats obtenus. Les distributions en nombre et en intensité correspondantes sont présentées dans la figure 3.6 et les tailles moyennes correspondantes sont de $D_{Nb}=128$ nm et $D_{Int}=219$ nm respectivement.

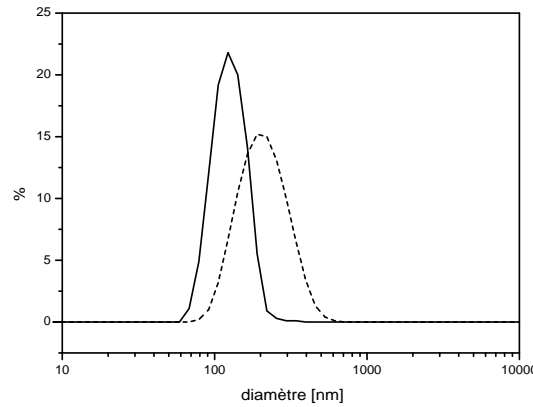


Figure 3.6 – Distributions de taille en intensité (pointillé) et en nombre (trait continu) de nanoparticules de KNbO_3 en suspension.

II.2 Détermination de la concentration

La concentration de la suspension aqueuse de KNbO_3 est déterminée par évaporation, comme décrit au paragraphe IV.2.d. On obtient une concentration massique :

$$C_0 = 0,1033 \text{ g.L}^{-1}$$

avec les mesures suivantes :

$$\begin{cases} m_{fl} = 7,5567 \text{ g} \\ m_{fl+nc} = 7,5598 \text{ g} \\ v_0 = 30 \text{ mL}, \end{cases}$$

La concentration unitaire N [cm^{-3}] est calculée à partir de cette concentration massique et du volume moyen des nanoparticules. En considérant le diamètre moyen en nombre donné par la DLS, le volume moyen des nanoparticules est $V = 1,098 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^{-3}$. La mesure du diamètre en intensité présente également un intérêt. Nous aborderons cet aspect de la caractérisation en taille par la suite.

A partir de la masse volumique du KNbO_3 , $\rho_{KN} = 4,62 \text{ g.cm}^{-3}$, on obtient le nombre de particules par unité de volume soit :

$$N = 2,04 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$$

II.3 Mesure du signal HRS

Les mesures optiques sont ensuite réalisées sur les suspensions colloïdales de KNbO_3 de différentes concentrations. Celles-ci sont issues de dilutions à partir d'une même suspension initiale et sont testées dans la même configuration expérimentale, c'est-à-dire avec une polarisation incidente verticale et une détection à 90° sans analyseur. Le signal moyen I_{HRS} est ensuite tracé, pour chaque dilution, en fonction de la concentration relative par rapport à celle de la suspension initiale, comme présenté dans la figure 3.7 (a).

En parallèle, le même type de mesure est réalisé sur des solutions de pNA dans du méthanol, et le signal HRS est donné en fonction de la concentration molaire $[\text{mol.L}^{-1}]$ de chaque solution (fig. 3.7 (b)).

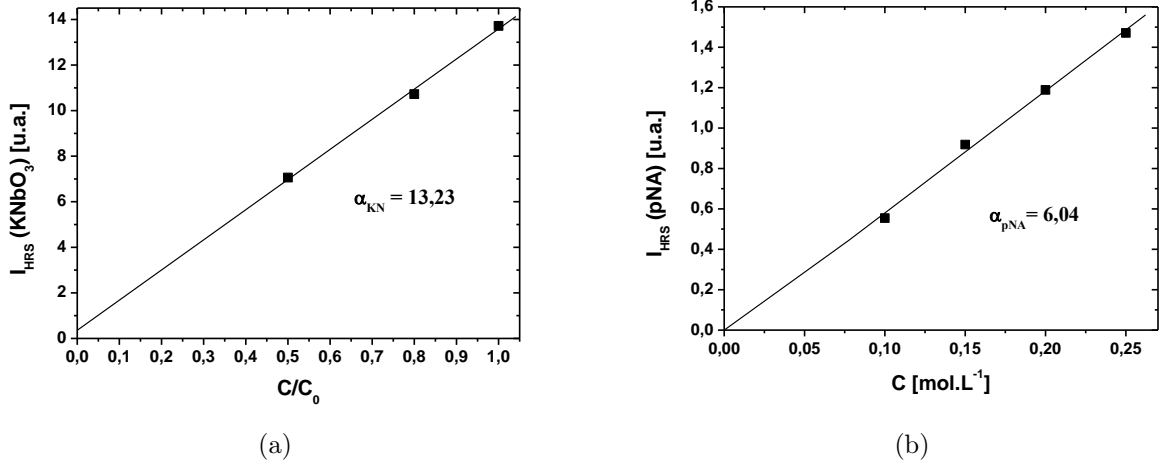


Figure 3.7 – Intensité HRS en fonction de la concentration (a) de la suspension de KNbO_3 et (b) de la solution de pNA.

Un simple fit linéaire permet de retrouver le coefficient directeur de ces droites, de 13,23 pour le KNbO_3 et de 6,04 pour le pNA. Notons que l'ordonnée à l'origine, correspondant à des concentrations nulles en particule ou en pNA, ne dépend théoriquement que de la réponse HRS des solvants mis en jeu. Elle est très faible par rapport à la GSH des particules ou du pNA ce qui justifie, pour notre banc expérimental, l'utilisation de la méthode de la référence externe.

II.4 Calcul des coefficients moyens

Les coefficients directeurs α_{KN} et α_{pNA} doivent être tous les deux convertis pour des concentrations unitaires, c'est-à-dire en nombre de particules ou de molécules par unité de volume. Pour des concentrations en $[\text{cm}^{-3}]$ par exemple, on a pour KNbO_3 :

$$\alpha_{KN} = \frac{\alpha_{KN}^{mesure}}{N} = 6,50 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-3}$$

Pour le pNA :

$$\alpha_{pNA} = \frac{\alpha_{pNA}^{mesure}}{N_A} \times 1000 = 1,00 \cdot 10^{-20} \text{ cm}^{-3}$$

Le facteur de champ interne pour des nanoparticules de KNbO_3 (d'indice de réfraction $n_{nc} = 2,23$) en suspension dans l'eau (d'indice $n_s = 1,33$), est calculé selon l'équation 2.33 et on a :

$$T_{KN/eau} = 0,624^6$$

Le facteur de champ local pour le pNA dans le méthanol, avec $n_m = 1,32$, vaut :

$$F_{meth} = 1,25^6$$

A partir de ces valeurs, on en déduit l'hyperpolarisabilité des particules de KNbO_3 :

$$\langle \beta_{KN} \rangle = \sqrt{\frac{\alpha_{KN}}{\alpha_{pNA}} \frac{F_{pNA}}{T_{KN}}} \langle \beta_{pNA} \rangle = 2,04 \cdot 10^6 \times \sqrt{\frac{6}{35}} 25,9 \cdot 10^{-30} \text{ esu} = 2,19 \cdot 10^{-23} \text{ esu}$$

Le coefficient moyen $\langle d \rangle$ est relié à l'hyperpolarisabilité moyenne par le volume des nanoparticules. Nous utilisons dans cet exemple le diamètre moyen en nombre mesuré en DLS. En prenant en compte les conversions d'unités (cf. § I.1), on calcule :

$$\langle d_{KN} \rangle = \frac{\langle \beta_{KN} \rangle}{V} \times 4,19 \cdot 10^{-10} = 8,3 \text{ pm} \cdot \text{V}^{-1}$$

Il est intéressant de terminer par une comparaison de ce coefficient moyen à celui du KNbO_3 massif ($\langle d_{KN} \rangle = 17,3 \text{ pm/V}$) donné dans la littérature (voir annexe F).

Conclusion

Dans cet exemple, nous avons déterminé les coefficients moyens du KNbO_3 à partir de mesures HRS et de suspensions caractérisées en taille et en concentration. Rappelons que la valeur de $\langle \beta \rangle$ caractérise l'efficacité optique de la particule et dépend de la taille de celle-ci. Le coefficient $\langle d \rangle$ caractérise le matériau et peut être comparé au coefficient de cristaux massifs du même matériau. Malgré une certaine différence, les deux valeurs sont du même ordre de grandeur à savoir 10 pm/V .

III Validité du protocole

Après cette présentation du protocole, il est maintenant intéressant de se pencher sur la validité des mesures mise en jeu. L'objectif est ici de discuter de la pertinence et de la précision des résultats obtenus. Les erreurs expérimentales peuvent avoir des origines variées. Nous nous intéresserons dans un premier temps à la qualité de l'acquisition optique en prenant en compte les différentes sources d'imprécision liées au système expérimental, aux échantillons de référence et aux suspensions colloïdales elles-mêmes. Par la suite, nous étudierons plus en détail l'influence de la caractérisation de la taille et de la concentration des particules.

III.1 Signal HRS

Dans un premier temps, il est nécessaire de s'assurer que les conditions expérimentales sont fiables et reproductibles. Ensuite, nous nous intéresserons au signal optique réel émis par les échantillons et aux artefacts qu'il peut contenir par rapport au signal HRS théorique d'une solution moléculaire.

III.1.a Optique

Le signal HRS détecté peut varier d'une mesure à l'autre en raison de facteurs expérimentaux tels que l'alignement des éléments optiques, la présence de signaux parasites lumineux, la stabilité du laser, etc. Nous détaillons dans cette section les diverses sources d'erreurs liées aux conditions expérimentales et en particulier au système de détection optique.

♦ Réglages optiques et erreurs d'offset

Les réglages optiques ne sont pas très nombreux et en pratique il est relativement aisé d'optimiser le signal HRS. La principale difficulté consiste à contrôler les signaux parasites, responsables d'un faible offset pouvant fausser les mesures. Cet offset peut être mesuré avant ou après la mesure, puis soustrait au signal afin de corriger les erreurs. L'utilisation du montage avec le chopper (cf. § III) a permis de résoudre partiellement ce problème et de faciliter la mesure : l'offset est ainsi éliminé en temps réel.

◊ Fluctuations et stabilité du laser

Pour s'assurer de la stabilité du signal à moyen terme, nous avons réalisé des tests sur des durées de l'ordre de 50 à 500 s. La figure 3.8 montre le signal émis par une solution de pNA de $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ lors d'une excitation laser continue d'une part, c'est-à-dire en mode pulsé mais sans interruption, et d'autre part par intervalles réguliers d'illumination (mode ON) et d'obscurité (mode standby). On constate que le

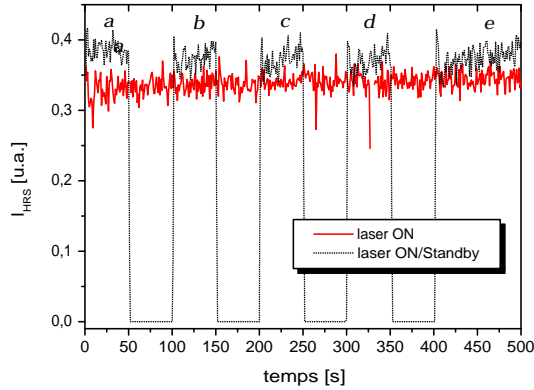


Figure 3.8 – (a) Signal HRS du pNA sous illumination pendant 500 s (rouge) et par intervalles de 50 s (noir, pointillés).

signal émis en continu sur 500 s fluctue mais il n'y a pas d'évolution du signal moyen au cours du temps. Rappelons ici qu'il s'agit d'un signal déjà traité donc moyenné. L'amplitude des fluctuations donne une idée de la précision de la mesure, qui est ici estimée à 0,02 u.a., soit 6% du niveau de signal.

Lorsque le laser est arrêté, ce qui est nécessaire par exemple pour changer d'échantillon, les fluctuations en intensité sont de même amplitude, mais on remarque une légère tendance à l'augmentation au cours du temps. L'acquisition HRS devant être réalisée dans des conditions stables, un délai doit être respecté entre l'allumage du laser et le début de l'acquisition.

Par ailleurs, la comparaison des deux acquisitions (réalisées dans la même configuration mais à une heure d'intervalle) permet de détecter parfois une différence de niveau de signal d'environ 10% certainement liée au laser. Cela montre l'importance de réaliser les mesures du signal de l'échantillon et de la référence consécutivement.

◊ Sensibilité

Comme nous l'avons abordé au chapitre précédent, le système expérimental doit être suffisamment sensible pour réaliser une mesure fiable. Nous avons pu voir que le signal issu de solution de pNA était très aisément détecté. Les mesures réalisées sur des suspensions colloïdales ne posent ici pas de problème particulier puisque leur signal est nettement plus élevé que celui du pNA. Le niveau de signal est donc largement suffisant pour notre système expérimental.

◊ Conclusion

Ces différentes observations nous permettent de définir les précautions à prendre pour réaliser une mesure fiable. Nous avons vu que les réglages optiques étaient relativement simples et ne nécessitent pas de précision extrême. Le problème d'offset a pu être résolu grâce à l'utilisation d'un hacheur de signaux, permettant la soustraction de l'offset en temps réel. Les fluctuations liées au laser sont une autre cause d'imprécision. Pour limiter les erreurs à court ou moyen terme, on attend alors que le signal se stabilise après allumage. Sur le long terme, nous avons vu que les variations sont trop importantes pour comparer deux mesures. On contourne ce problème en réalisant des acquisitions HRS consécutives de l'échantillon étudié et d'une référence. Pour finir, on a pu vérifier que la précision et la sensibilité du système sont suffisantes pour les niveaux de signaux mis en jeu.

III.1.b Luminescence et signaux parasites

La génération de second harmonique des nanoparticules est normalement la source du signal détecté. Cependant, dans certains cas, il peut être faussé par la présence d'autres signaux émis à la même longueur d'onde dans les mêmes conditions d'excitation. Pour s'assurer de l'absence d'émission de luminescence, parasite dans le cas de notre étude, nous avons donc mesuré les spectres d'émission des échantillons.

A l'aide d'un monochromateur, le signal émis par l'échantillon est analysé pour une longueur d'onde comprise entre 400 à 800 nm. De cette manière, il est relativement facile d'observer la présence éventuelle de signaux parasites tels que la fluorescence (pour laquelle on s'attend généralement à des bandes spectrales larges) tandis que la GSH est uniquement diffusée à 532 nm.

La figure 3.9 présente les résultats de cette expérience pour une suspension de KNbO_3 . On remarque

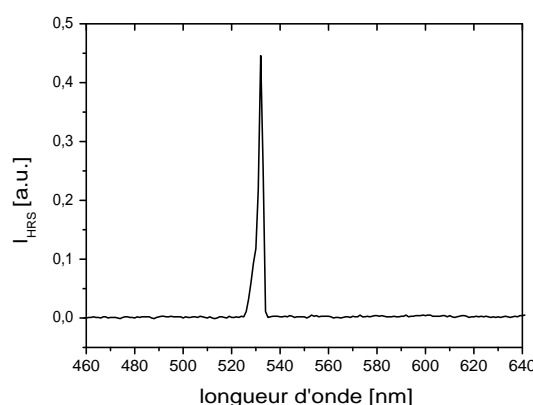


Figure 3.9 – Analyse spectroscopique du signal émis par une suspension de KNbO_3 sous excitation à 1064 nm.

un pic étroit à 532 nm, correspondant clairement à une émission de second harmonique. On en conclut donc à l'absence de luminescence pour ce matériau. Cette expérience a été réalisée systématiquement pour les autres matériaux étudiés (cf. annexe E) démontrant ainsi la seule présence d'un signal HRS.

III.1.c Stabilité des échantillons de référence

Le pNA, utilisé comme molécule de référence, doit évidemment être stable afin de réaliser des mesures fiables. La figure 3.10 compare l'intensité HRS en fonction de la concentration en pNA pour deux séries d'échantillons, 1 et 2. La deuxième série a été préparée 18 mois après la première pour la remplacer, afin d'éviter les incertitudes liées au vieillissement de la solution. Les deux séries ont des réponses HRS très proches, permettant de constater la stabilité des solutions sur plusieurs mois. La légère différence est probablement liée à une incertitude sur la concentration des solutions initiales. La comparaison des pentes correspond à un facteur de correction de 0,98, ce qui permet d'obtenir une comparaison fiable des résultats obtenus avec une série ou l'autre. Par ailleurs, on remarque que l'échantillon de concentration $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ de la série 1 (plus fréquemment utilisé que les autres en pratique) émet une intensité bien supérieure à celle attendue pour cette concentration. Cela peut s'expliquer par l'augmentation réelle de la concentration en pNA en raison de l'évaporation partielle du solvant par chauffage dû au laser. On suppose alors que l'excitation laser a entraîné par chauffage Ces résultats permettent de conclure sur une bonne stabilité des solutions au cours du temps, et soulignent l'importance de renouveler ces échantillons de référence régulièrement en raison du vieillissement par illumination laser.

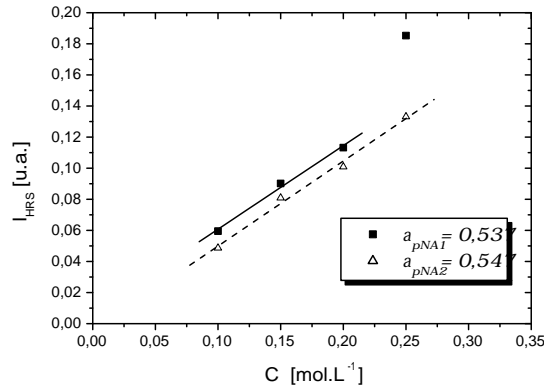


Figure 3.10 – Comparaison du signal de deux séries de pNA

III.1.d Stabilité des suspensions

La stabilité des particules en solution aqueuse est caractérisée par le potentiel zêta qui donne une indication sur le comportement des suspensions. Lorsque le potentiel zêta est faible, on observe une sédimentation responsable de la diminution de la concentration effective de la suspension.

Un exemple d'échantillon peu stable est présenté figure 3.11. Durant l'acquisition de la réponse HRS en polarisation (temps d'acquisition ~ 1 min.), on observe une chute du signal liée à la sédimentation des nanocristaux après agrégation.

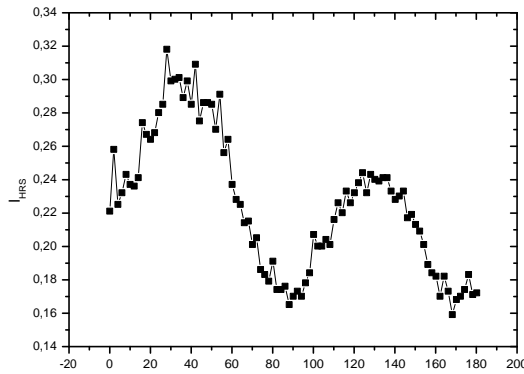


Figure 3.11 – Exemple d'instabilité du signal HRS au cours d'une mesure en polarisation d'une suspension de ZnO.

D'une manière générale, les mesures optiques sont réalisées peu de temps après la préparation des échantillons, afin d'éviter les imprécisions sur la concentration dues à la sédimentation. De plus, les échantillons sont retournés ou secoués juste avant la mesure. La mesure optique est ensuite validée si elle présente une réelle stabilité sur le temps d'acquisition. Dans le cas contraire, les mesures doivent être recommencées sur de nouveaux échantillons, d'où l'importance de contrôler l'évolution des surnageants lors de la préparation, comme discuté au paragraphe IV.2.e du chapitre 2.

III.1.e Agrégation

La question qui se pose ici concerne l'effet de l'agrégation sur le signal HRS. Nous cherchons d'une part à déterminer les sources d'erreur dans notre protocole de mesure et d'autre part, et d'un point de vue plus amont, si le signal résulte de la diffusion incohérente de particules isolées et de petite taille, qu'en est-il des agrégats ? Pour répondre à cette question, nous avons préparé une suspension de ZnO dans l'éthanol, par prélèvement du surnageant après sédimentation. Nous avons ensuite mesuré régulièrement et sur plusieurs jours la taille des particules ainsi que le signal HRS. Afin de limiter les erreurs dues aux variations de concentration par sédimentation, les échantillons sont légèrement secoués avant chaque mesure. Par ailleurs, les mesures s'étalant sur plusieurs jours, les signaux sont normalisés par rapport à la référence du pNA. L'agrégation des particules en suspension n'est pas un phénomène facile à maîtriser. On constate cependant qu'il est possible d'observer une augmentation de la taille régulière et significative (de 100 nm à 350 nm) pour un vieillissement de l'échantillon d'une semaine (fig. 3.12 (a)). Il est important de noter que cette augmentation ne peut être ici due qu'à la formation d'agrégats.

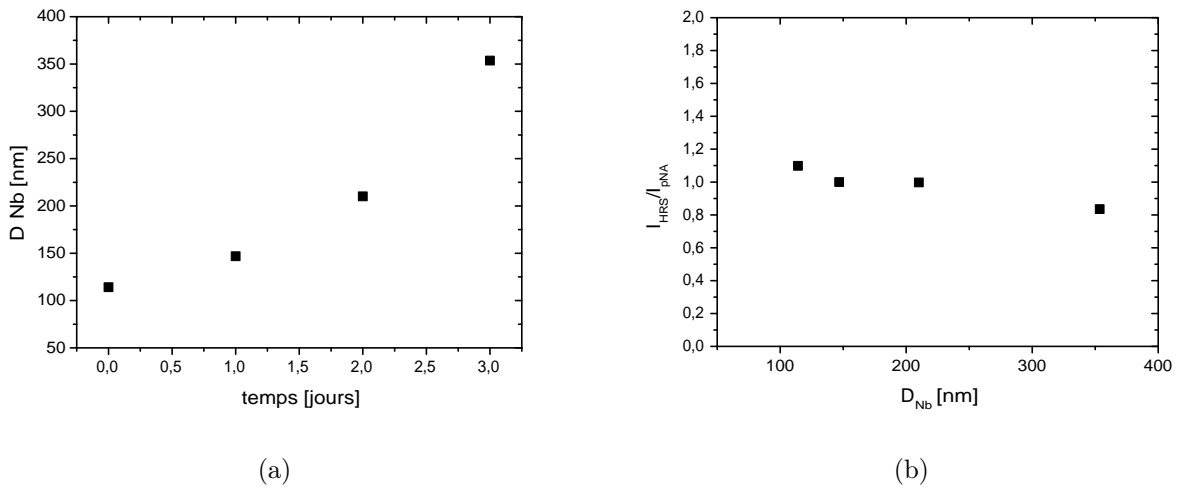


Figure 3.12 – (a) Agrégation de particules de ZnO au cours du temps. (b) Intensité HRS en fonction de la taille des agrégats.

La figure 3.12 (b) présente l'intensité HRS en fonction de la taille des agrégats formés. On constate peu de variations et la faible diminution observée pour de gros agrégats est sans doute reliée à la diminution de la concentration sondée, les agrégats pouvant sédimenter ou se coller contre les parois du pilulier. Ces résultats permettent donc de conclure à une faible influence de l'agrégation sur le signal HRS pour ces suspensions de ZnO, limitant ainsi une source d'erreur possible. Cela démontre également qu'il n'existe pas d'orientation spécifique entre les nanocristaux au sein des agrégats. En effet, pour un agrégat de particules orientées, on peut supposer que le signal émis par celui-ci résulterait de la somme cohérente des différentes ondes générées au sein de chaque nanocristal. Dans ce dernier cas, l'augmentation de l'intensité HRS serait très nette car fonction du volume au carré des agrégats. Ce n'est clairement pas ce qui est observé avec ces mesures. Ces résultats nous permettent de souligner enfin une hypothèse importante pour l'analyse des données : le signal HRS détecté est la somme incohérente des ondes de second harmonique diffusées par chaque nano-(mono)cristal de la suspension. C'est donc la taille de ces nanocristaux qui est ici le paramètre important. Nous reviendrons sur ce point dans les parties suivantes.

III.1.f Régime de Rayleigh

En HRS, on fait l'hypothèse selon laquelle les particules sont suffisamment petites pour être considérées comme des objets ponctuels. Cela implique une taille bien inférieure à la longueur d'onde. On suppose alors que le rayonnement de diffusion de ces objets est isotrope.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des mesures HRS dans différentes directions de détection, allant de la direction perpendiculaire, habituellement utilisée, à une détection en transmission, à 180° . Pour cela, un système expérimental constitué d'un bras rotatif a été mis en place. Le banc de détection est placé sur ce bras, comme indiqué sur la figure 3.13, dont l'axe de rotation se situe au centre de l'échantillon, dans l'alignement du faisceau laser.

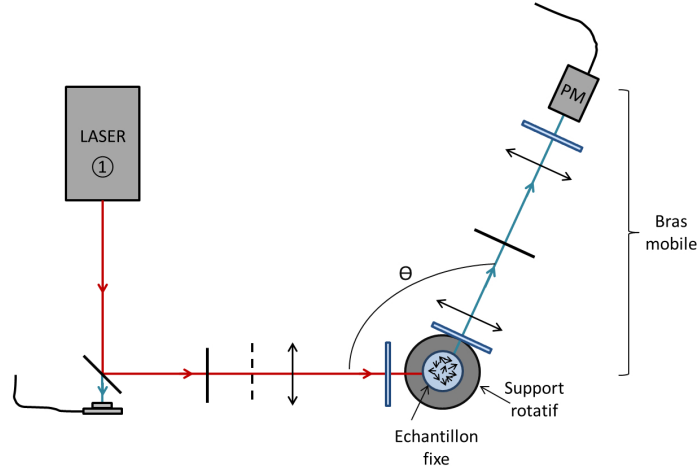


Figure 3.13 – Schéma du dispositif expérimental avec θ l'angle de détection du signal HRS.

Les états de polarisation pouvant entraîner une modification du signal avec l'angle θ , il est nécessaire de se placer dans une configuration pour laquelle il y a réellement isotropie de l'intensité diffusée. La configuration choisie comprend une polarisation incidente verticale et aucun analyseur. L'augmentation du signal en fonction de θ d'une solution moléculaire dans cette configuration caractérise uniquement la différence d'efficacité de collection selon l'angle de détection. Afin d'obtenir des résultats comparables nous avons donc normalisé l'intensité HRS des suspensions par celle d'une solution de pNA, pour chaque direction de détection.

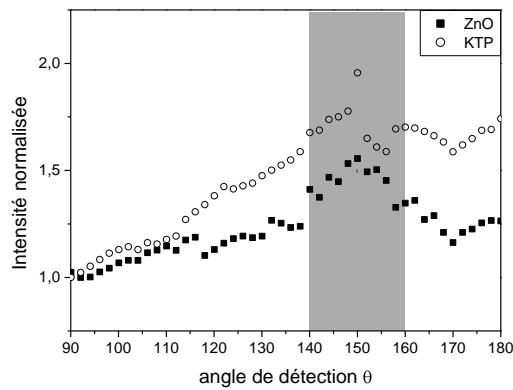


Figure 3.14 – Intensité HRS normalisée de suspensions de ZnO et de KTP en fonction de l'angle de détection. Les fluctuations observées entre 140° et 160° sont liées à des parasites optiques dus à l'interaction entre le faisceau laser et des éléments du montage et ne sont pas significatives.

Nous avons réalisé les mesures (fig. 3.14) sur des suspensions de ZnO, de taille moyenne 130 nm, proche de la plupart des échantillons étudiés. Nous avons également utilisé des suspensions de KTP, de diamètre plus important (~ 200 nm).

Pour les particules de ZnO, le rayonnement est considéré comme isotrope puisque l'intensité diffusée en fonction de θ évolue peu. Dans le cas des particules de KTP, on observe une légère augmentation du signal diffusé vers l'avant. Cette expérience nous permet de valider l'hypothèse du régime de Rayleigh pour le plupart de nos échantillons.

III.1.g Absorption et diffusion

Les suspensions de nanoparticules étudiées ont des concentrations massiques typiques de l'ordre de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$. A ces faibles concentrations, les effets d'absorption et de diffusion sont généralement peu visibles. L'absorption des matériaux étudiés ici est généralement faible aux longueurs d'onde d'excitation et de second harmonique, respectivement 1064 et 532 nm. Cependant, lorsque la concentration des suspensions augmente, des phénomènes de diffusion sont parfois observés sur le signal HRS.

Sur la figure 3.15, on observe l'intensité HRS d'un échantillon de particules de KNbO_3 dans l'éthanol en fonction de la concentration relative. La concentration absolue de cette suspension a été déterminée à $0,557 \text{ g.L}^{-1}$, soit $2,4 \cdot 10^{11}$ particules/ cm^3 . Cela correspond à une concentration relativement élevée.

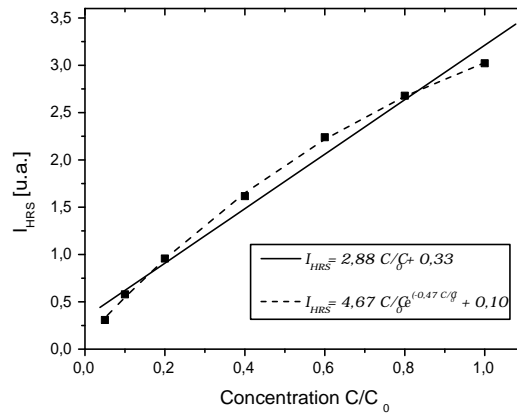


Figure 3.15 – Effet de la diffusion sur une suspension concentrée de KNbO_3 .

On remarque qu'une régression linéaire ne permet pas d'ajuster correctement les données expérimentales et que la valeur de l'ordonnée à l'origine est élevée pour un solvant tel que l'éthanol. En incluant l'effet de la diffusion dans le fit par un facteur de correction, on obtient un bien meilleur comportement. La différence des pentes obtenues par chaque fit est suffisamment importante pour entraîner une variation d'environ 20%. Cela montre l'intérêt de prendre en compte ces phénomènes d'absorption et de diffusion dans le dépouillement des résultats, ou, en pratique, de limiter la concentration pour rester dans un domaine où l'intensité varie linéairement avec la concentration.

Conclusion

Ces différentes expériences permettent de clairement montrer les précautions à prendre pour réaliser des mesures quantitatives fiables par la méthode de la référence externe. Nous avons déjà évoqué les conditions expérimentales permettant d'obtenir un signal optique stable et fiable. L'instabilité du signal sur le long terme peut être corrigée grâce à l'utilisation d'une référence, nécessaire par ailleurs pour la méthode de référence externe, dans la mesure où les signaux de la référence et de l'échantillon sont détectés dans un court laps de temps, c'est-à-dire consécutivement. La vérification de la stabilité de la référence permet de valider ce protocole. Par ailleurs, la présence de parasites lumineux tels que la fluorescence est systématiquement contrôlée. La stabilité des suspensions est également contrôlée en surveillant la stabi-

lité du signal optique. Les erreurs liées à la diffusion (pour des échantillons de concentration élevée) sont écartées en utilisant des concentrations suffisamment faibles pour lesquelles l'intensité augmente linéairement avec la concentration. Pour finir, nous avons également vérifié que les phénomènes d'agrégation n'ont pas d'effet sur le signal HRS.

III.2 Mesures de taille des nanoparticules

La caractérisation en taille des échantillons est une étape essentielle pour la détermination des coefficients ONL moyens. En effet, comme on l'a vu précédemment, l'intensité HRS augmente avec le volume au carré des nanoparticules et est proportionnelle à la concentration des suspensions. Or, cette dernière est calculée à partir du volume moyen des particules en tenant compte de la concentration massique. Pour caractériser la taille des particules, nous avons principalement utilisé la technique DLS et nous présentons dans cette partie l'influence de la polydispersité, de l'agrégation et de la forme des particules, en s'appuyant sur des exemples de suspensions étudiées.

III.2.a Effet de la polydispersité

Une des principales difficultés constatées lors des mesures provient de la polydispersité des suspensions. Si la DLS fournit des résultats fiables sur des échantillons monodisperses, l'interprétation peut s'avérer délicate dans le cas contraire. C'est une limite bien connue de la technique DLS, basée sur la détection des fluctuations de l'intensité diffusée par des particules. En effet, dans le régime de Rayleigh, l'intensité diffusée est proportionnelle à D^6 , D étant le diamètre. Dans certains cas, l'intensité diffusée par les particules les plus grandes de la suspension peut masquer le signal des plus petites, qui ne sont pas correctement détectées. La technique DLS permet de mesurer une distribution de taille en intensité : le maximum de cette distribution ne correspond donc pas à la taille pour laquelle les particules sont les plus nombreuses, mais à la taille pour laquelle l'intensité émise est la plus élevée. Par calcul, on peut remonter à des distributions en volume ou en nombre mais si la distribution en intensité est erronée, cela se répercute évidemment sur les autres distributions.

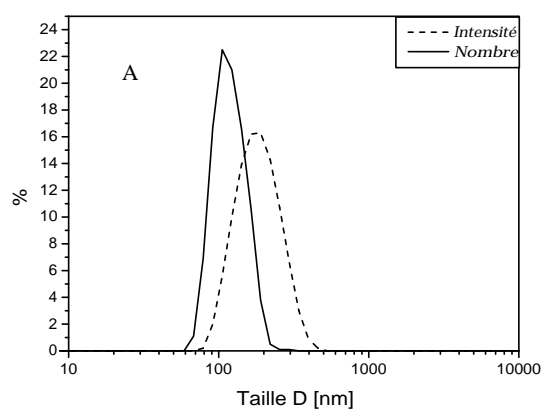
◊ Comparaison de deux échantillons

La figure 3.16 présente la distribution en taille de deux échantillons de LiNbO_3 obtenue par DLS. La mesure en intensité de l'échantillon A est de type monomodal, avec un seul pic relativement étroit indiquant une faible dispersion en taille. L'échantillon B présente quant à lui un pic principal de dispersion nettement plus large, ainsi qu'un deuxième pic de plus faible amplitude. Ramenées en nombre, les distributions de ces deux échantillons sont proches. Le diamètre moyen de l'échantillon B, légèrement plus élevé, est de 132 nm contre 121 nm pour l'échantillon A. D'après les résultats de la DLS, l'indice de polydispersité, de 0,08 pour la première indique une distribution presque monodisperse. La seconde est référencée comme une suspension de polydispersité moyenne avec un indice de 0,25.

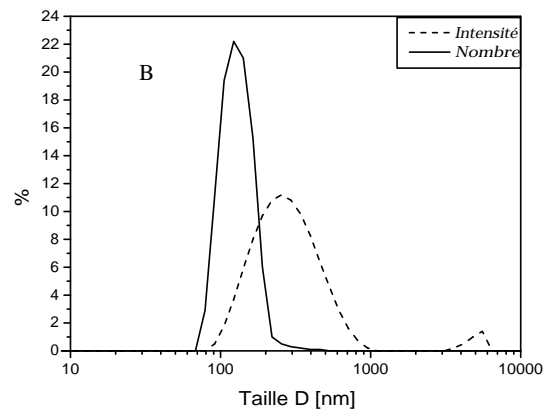
Afin de mettre en évidence l'imprécision sur la mesure liée à la polydispersité, nous avons également comparé ces résultats à une autre technique de mesure. L'analyse de nanoparticules par suivi (ou NTA, pour Nanoparticle Tracking Analysis) est une technique également basée sur le signal de diffusion des nanoparticules, mais pour laquelle la taille est estimée particule par particule, permettant une meilleure évaluation de la distribution en nombre. Ce type d'analyse est réalisé sur des échantillons très dilués. La comparaison des résultats DLS aux mesures NTA (Nanosight) permet d'avoir une idée de l'erreur réalisée sur la distribution obtenue en DLS.

Reprenons les deux échantillons de LiNbO_3 précédemment étudiés en DLS et observons maintenant les résultats donnés en NTA (présentés dans la figure 3.17), en parallèle avec les résultats en nombre de la DLS. La distribution NTA présentée ici est un peu plus précise puisque la taille de chaque particule est identifiée individuellement. On remarque ici, en accord avec les observations de la DLS en intensité, que l'échantillon A est monomodal tandis que le B comporte plusieurs pics distincts.

Si l'on compare maintenant les résultats obtenus avec chaque méthode d'analyse, il apparaît évident que la précision est bien meilleure sur l'échantillon A : la distribution en nombre donnée par la DLS est corroborée par celle donnée en NTA. Pour l'échantillon B en revanche, la différence est nettement plus marquée et les valeurs moyennes obtenues par les deux techniques présentent une variation de 20%.

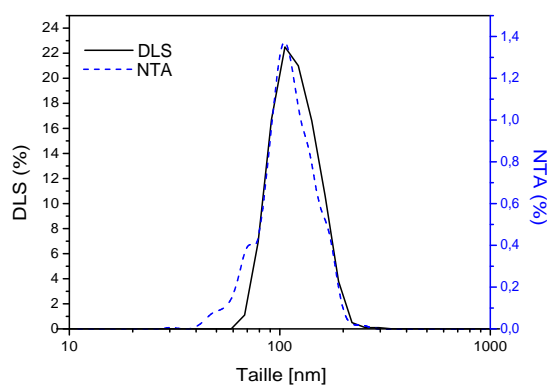


(a)

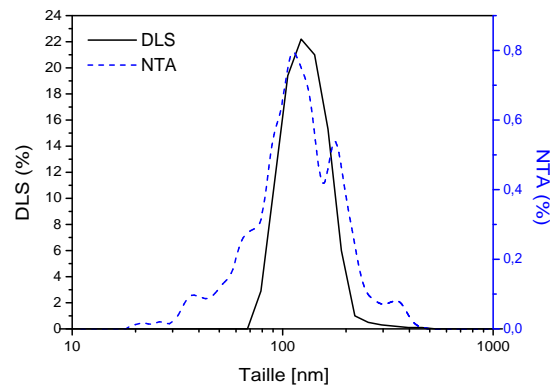


(b)

Figure 3.16 – Distribution de taille obtenue par DLS sur deux suspensions distinctes de LiNbO_3 : (a) échantillon A et (b) échantillon B.



(a)



(b)

Figure 3.17 – Comparaison des distributions DLS et NTA en nombre pour deux échantillons distincts A (a) et B (b) de LiNbO_3 .

Ces observations sont en accord avec les indications données par l'indice de polydispersité précédemment discutées.

La comparaison de ces deux techniques montre bien qu'un échantillon monomodal et de faible dispersion sera caractérisé avec beaucoup plus de fiabilité qu'un échantillon comportant une plus forte dispersion. La corrélation des résultats pour l'échantillon A indique une bonne qualité de caractérisation en DLS pour ce type de distribution.

◊ Échantillon très polydisperse

Un autre échantillon constitué de particules de KTP est également caractérisé en taille ci-dessous. La figure 3.18 montre les distributions en intensité (a) et en nombre (b) de cette suspension. Trois mesures sont réalisées successivement sur le même échantillon. On remarque que les résultats varient fortement d'une mesure à l'autre, donnant des tailles moyennes en nombre très différentes, de 153 nm, 95 nm et 193 nm respectivement pour chaque mesure. Ces disparités proviennent d'une forte dispersion en taille comme l'indique l'indice de polydispersité de la DLS égal 0,6. Par ailleurs, le "rapport qualité" de la DLS indique également une mesure peu fiable. Sur ce même échantillon, la caractérisation NTA présente

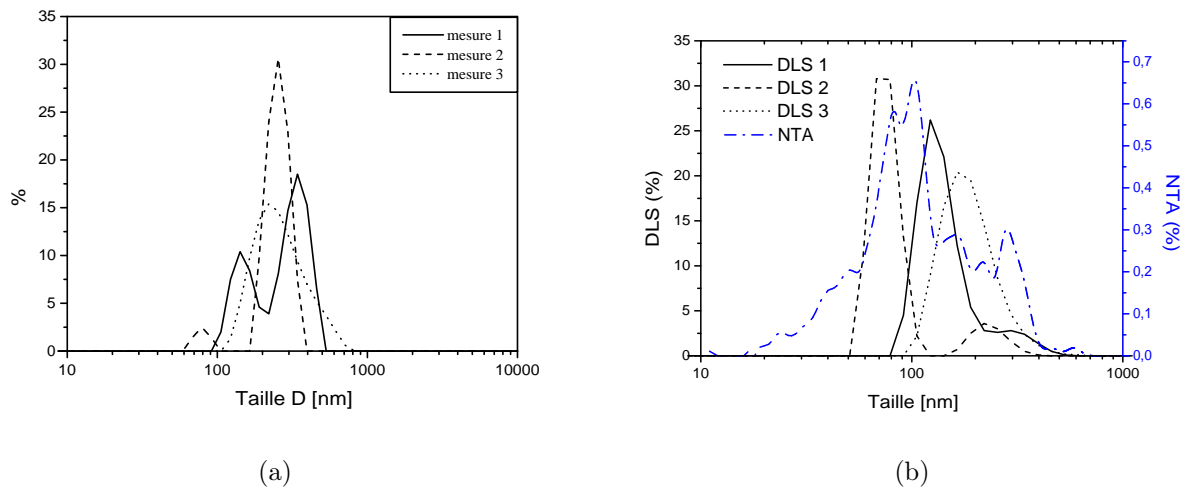


Figure 3.18 – (a) Distribution de taille en intensité pour trois mesures DLS successives sur une suspension de KTP et (b) distributions correspondantes en nombre par DLS et NTA.

également une forte polydispersité, avec la présence de plusieurs pics, comme le montre la figure 3.18 (b).

Par comparaison, un autre échantillon de KTP, réalisé à partir des mêmes poudres, a été caractérisé de la même manière. Les trois mesures successives sont similaires et la figure 3.19 (a) en présente le résultat. On remarque, comme précédemment pour le LiNbO_3 B, une dispersion en taille relativement large, ainsi qu'un deuxième pic de faible intensité vers 5000 nm. L'indice de polydispersité est ici de 0,3 et la qualité de la mesure bien meilleure que pour l'échantillon de KTP précédent.

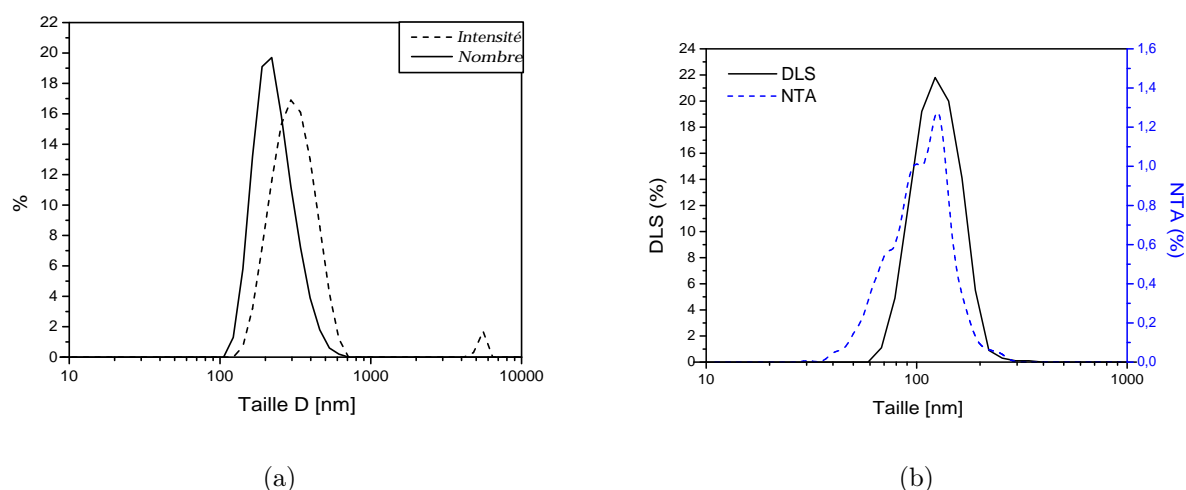


Figure 3.19 – (a) résultats DLS d’une deuxième suspension de KTP. (b) Distribution de taille en nombre obtenue par NTA sur la suspension de KNbO_3 .

La comparaison de ces deux échantillons montre qu’à partir des mêmes poudres, les suspensions obtenues peuvent être très différentes. Cela souligne l’importance de la préparation des suspensions. En particulier, il est important de surveiller l’étape de sédimentation, de manière à réduire fortement la polydispersité. Cela permet d’obtenir des suspensions dont la taille, paramètre essentiel pour les mesures optiques, est caractérisée avec le plus de précision possible.

Pour finir, on présente également les résultats obtenus en NTA, figure 3.19 (b), de la suspension de KNbO_3 étudiée au début de ce chapitre (cf. résultats DLS fig. 3.6). Comme on a pu le voir pour la suspension de LiNbO_3 A, la suspension présente une faible polydispersité et les résultats en DLS et NTA sont en très bonne adéquation, avec des diamètres moyens respectifs de 128 et 126 nm en nombre. Cela confirme la fiabilité des résultats DLS obtenus usuellement sur des suspensions faiblement polydisperses.

Ces observations montrent que la polydispersité peut parfois avoir une influence significative sur les tailles DLS. En effet, un échantillon dont les tailles sont très variables s’avère difficile à caractériser avec cette technique. Cependant, lorsque les échantillons sont faiblement polydisperses, la DLS est relativement fiable. C’est le cas lorsque la préparation des suspensions est réalisée avec soin, et en particulier l’étape de sédimentation. L’obtention de telles suspensions est évidemment facilitée lorsque les particules sont stables dans le solvant utilisé.

III.2.b Agrégats

Une autre difficulté pour une bonne interprétation de la taille des nanocristaux individuels réside dans la présence d’agrégats de particules. Or, la taille qui nous intéresse en HRS est celle de mono-cristaux, pour lesquels l’émission se fait de manière cohérente (cf. § III.1.e). Dans le cas où le surnageant étudié présente encore des agrégats, la DLS ne nous permet pas de le savoir et indiquera la présence de grosses particules là où il n’y en a que des petites.

On peut émettre l’hypothèse que la plupart des suspensions comportent des agrégats de particules. On considère alors que la taille moyenne donnée en nombre est sans doute surestimée par rapport à la taille moyenne des nanocristaux effectivement présents dans la suspension. Cependant, rien ne permet de confirmer ou d’infirmer cette hypothèse. La NTA, technique basée sur les mêmes procédés optiques, ne peut fournir aucune information complémentaire à ce sujet. Face à cette problématique, la solution la plus adéquate consiste à préparer les suspensions colloïdales avec une attention particulière aux étapes de désagrégation par ultrasons et de récupération du surnageant, afin d’éviter au maximum la présence d’agrégats en suspension.

Dans un cas plus extrême encore, si les particules sont agglomérées ou polycristallines, la taille réelle des monocristaux est alors impossible à connaître de cette manière. L'utilisation des valeurs données par la DLS entraînent alors une erreur sur la détermination des coefficients optiques. Lorsque les cristaux sont très petits, une étude des diagrammes de DRX au moyen de la formule de Scherrer permet d'estimer leur taille et de la comparer aux résultats de la DLS. Mais cette méthode ne peut être appliquée de manière précise à des cristaux de 50 nm et plus.

On peut également utiliser des caractérisations par microscopie électronique. Cette technique va permettre de qualifier l'état d'agglomération des particules. Néanmoins, la microscopie ne permet évidemment pas de caractériser le degré d'agrégation des suspensions, qui est une limite générale de notre démarche.

III.2.c Forme des particules

Le dernier paramètre à considérer provient de la forme non sphérique des particules. En effet, la DLS détermine les tailles en intensité en se basant sur la mesure du volume hydrodynamique des particules, c'est-à-dire le volume de solvant déplacé par le mouvement des particules. Lorsque la particule est sphérique, la taille hydrodynamique, bien que plus grande que le volume cristallin effectif, est une approximation acceptable pour définir la taille de la particule. En revanche, lorsque la particule a une forme quelconque, la DLS a tendance à sur-estimer la taille des particules. On observe le même comportement avec la méthode NTA, puisque cette technique est également basée sur la diffusion lumineuse des particules.

Conclusion

On a pu observer que la caractérisation par DLS était tout à fait adaptée lorsqu'il s'agit de distributions de particules monomodales et de faible dispersion. Les échantillons polydispersés ou instables peuvent être assez facilement écartés lorsque les distributions en intensité comportent plusieurs pics ou que différentes mesures successives ne donnent pas les mêmes résultats. Cependant, des erreurs dues à la forme non sphérique des particules ou à la présence d'agrégats, indétectables par DLS, peuvent subsister.

Cette discussion sur la taille des nanoparticules en suspension colloïdale souligne l'importance de la préparation des suspensions, incluant la désagrégation par ultrasons, pour éviter au maximum la présence d'agrégats, ainsi que les étapes de sédimentation et de récupération du surnageant qui permettent d'obtenir une dispersion la plus étroite possible. Par ailleurs, le choix des particules doit également tenir compte de leur aspect, de manière à sélectionner idéalement des particules relativement sphériques. Le développement des procédés de synthèse permettant un meilleur contrôle de la taille et de la forme des nanoparticules est également une piste à suivre pour améliorer la précision de la caractérisation en taille des particules.

III.3 Mesure de concentration des particules

La concentration des suspensions est l'un des paramètres à déterminer pour l'exploitation du signal HRS. Il est donc nécessaire de s'assurer de la précision de la mesure.

III.3.a Concentration massique

La concentration des suspensions est déterminée au moyen d'une mesure par pesée. Afin d'exploiter correctement les données HRS, il est important de travailler avec des mesures de concentration suffisamment précises.

La mesure de concentration massique, réalisée selon le protocole décrit précédemment au paragraphe IV.2.d du chapitre II, fait appel à de très faibles masses mesurées. La précision de cette mesure dépend en fait principalement de deux valeurs. D'une part, la masse du flacon utilisé pour la pesée doit être relativement faible par rapport à la masse de poudre de nanoparticules, de manière à obtenir une différence

de masse appréciable avant et après évaporation. D'autre part, le volume évaporé doit être élevé si l'on veut justement obtenir une quantité de poudre significative. Ces deux contraintes nous amènent à utiliser un petit contenant de la taille d'un pilulier, d'une masse d'environ 7 g, et à le remplir d'un volume précis de suspension à plusieurs reprises, en laissant évaporer le solvant entre chaque remplissage. De cette manière, on diminue nettement l'incertitude de mesure sur la masse.

L'incertitude de mesure est donnée par :

$$\frac{\Delta C_0}{C_0} = \frac{2\Delta m}{m_{nc}} + \frac{\Delta v_{sol}}{v_{sol}}$$

avec les valeurs :

$$\left\{ \begin{array}{l} \Delta m = 5.10^{-5} \text{ g, d'après la précision de la balance utilisée, pour une masse d'environ 7 g} \\ \Delta v_{sol} = 2.10^{-2} \text{ mL, selon la précision de la pipette,} \\ m_{nc} = m_{fl+nc} - m_{fl} \text{ masse de la poudre de nanocristaux,} \\ v_{sol} \text{ volume de solution évaporée.} \end{array} \right.$$

Pour la suspension de KNbO_3 étudiée au paragraphe II, cela donne :

$$\frac{\Delta C_0}{C_0} = 0,033$$

D'où une concentration massique :

$$C_0 = (0,103 \pm 0,003) \text{ g.L}^{-1}$$

La mise en application des précautions décrites précédemment rend ainsi cette incertitude de mesure tout à fait acceptable.

III.3.b Concentration N

A partir de la concentration massique et de la taille des particules, il est ensuite facile de calculer le nombre de particules par unité de volume présentes dans la suspension. Pour la même suspension de KNbO_3 , par exemple, on a déterminé une concentration $N = 2,04.10^{10} \text{ cm}^{-3}$.

On compare cette concentration à celle obtenue par NTA. Cette méthode, utilisant des suspensions très diluées, compte les particules une à une et permet d'estimer assez précisément la concentration. La même suspension donne, avec cette technique : $N_{NTA} = 1,35.10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Les deux valeurs diffèrent d'un facteur 1,5. La valeur obtenue par pesée est donc proche. Nous verrons par la suite que la différence constatée peut s'expliquer en raison de la polydispersité des échantillons.

Pour la suspension de LiNbO_3 A, l'erreur est du même ordre, tandis que la suspension de KTP polydisperse présentée précédemment donne une concentration par pesée de $8,41.10^9 \text{ cm}^{-3}$ pour une concentration NTA de $2,68.10^8 \text{ cm}^{-3}$. Cette différence s'explique par l'accumulation de deux erreurs. D'une part, l'incertitude relative sur la concentration par pesée est plus élevée que pour les autres suspensions (on a $\Delta C/C = 0,12$ au lieu de $0,03$ précédemment), et d'autre part, l'erreur liée à l'estimation de la taille en DLS en raison de la dispersion en taille plus importante.

Conclusion

Ces observations permettent de conclure quant à la fiabilité de la détermination de la concentration par pesée. Les résultats sont validés à deux conditions. D'une part, le protocole de mesure de concentration doit être effectué en prenant en compte une masse significative de particules par rapport à la masse totale pesée. D'autre part, la mesure de taille doit également être fiable car ce paramètre a une influence non négligeable sur la concentration finale.

III.4 Influence de la distribution en taille sur l'intensité HRS

Précédemment, nous avons vu que la fiabilité de la taille en nombre donnée par la DLS est correcte lorsque les suspensions sont peu dispersées en taille. En considérant cette distribution en nombre fiable, il faut ajouter que la valeur de taille utilisée est une valeur moyenne. Cela signifie que l'intensité HRS détectée est analysée comme si elle provenait d'échantillons exactement monodisperses, c'est-à-dire dont toutes les particules sont de même taille. Mais que se passe-t-il si l'on prend en compte la totalité de la distribution ?

◊ Simulation des intensités HRS issues d'échantillons monodisperse et polydisperse

Afin de percevoir l'influence de la distribution en taille sur l'intensité HRS, il est nécessaire de connaître comment varie cette intensité en fonction de la taille des particules. On rappelle l'expression de l'intensité HRS d'une suspension de nanoparticules en fonction du coefficient moyen $\langle d \rangle$ du matériau :

$$I_{HRS} = GNTV^2 < d^2 > I_{\omega}^2 \quad (3.1)$$

Le signal HRS est proportionnel au volume au carré de la particule. On voit alors que l'intensité émise par les particules de taille supérieure à la taille moyenne de la distribution peut devenir prédominante.

On cherche ici à simuler l'influence de cette distribution sur le signal HRS. Pour cela, on considère deux échantillons. Le premier est exactement monodisperse et ne contient donc que des particules d'une même taille. C'est le cas considéré lors de l'exploitation des données. Le second est lui polydisperse et l'on représente la dispersion par une loi normale de même moyenne que l'échantillon monodisperse.

Au moyen de calculs statistiques explicités dans l'annexe D, on peut alors déterminer le rapport des intensités pour ces deux échantillons. Bien évidemment, ce rapport va dépendre du profil de la distribution polydisperse, c'est-à-dire de son écart-type (σ), et plus précisément du rapport entre cet écart-type et la moyenne σ/μ . Le tableau 3.2 présente le rapport de l'intensité émise par l'échantillon polydisperse, notée I_{poly} et de celle émise par l'échantillon monodisperse, notée I_{mono} en considérant les distributions expérimentales présentées précédemment, à savoir KNbO_3 , LiNbO_3 A, LiNbO_3 B, et la seconde de KTP (fig. 3.19 (a)).

Ces calculs sont réalisés dans un premier temps à partir d'une approximation gaussienne de la distribution en taille des particules dont les paramètres sont issus de la DLS. L'utilisation d'une loi log-normale, asymétrique, permet généralement de représenter ces distributions avec une meilleure approximation. Les mêmes rapports d'intensité sont donc également calculés en suivant cette autre loi de distribution (cf. annexe D).

Tableau 3.2 – Simulation de l'intensité HRS d'un échantillon polydisperse relativement à un échantillon monodisperse de même moyenne.

Echantillons	D_{moy} [nm]	σ [nm]	$\frac{\sigma}{\mu}$	$\frac{I_{poly}}{I_{mono}}$ loi normale	$\frac{I_{poly}}{I_{mono}}$ loi log-normale
KNbO_3	128	31	0,24	1,99	2,87
LiNbO_3 A	125	30	0,24	1,99	2,82
LiNbO_3 B	132	36	0,27	2,31	3,81
KTP	237	76	0,32	2,93	6,37

On remarque ici, par exemple, que l'intensité HRS détectée pour un échantillon tel que celui de KNbO_3 exploité précédemment est 2 à 3 fois plus importante que l'intensité détectée pour un échantillon comprenant uniquement des particules de 128 nm. Pour des suspensions de distribution relativement large telle que celle du KTP, l'intensité de la suspension monodisperse est nettement plus faible, de 3 à 6,4 fois moins importante que celle émise par la suspension polydisperse.

L'intensité émise par une suspension polydisperse est, comme on le supposait, supérieure à celle d'une suspension monodisperse. Lorsque l'on calcule le paramètre $\langle d \rangle$, on surestime sa valeur si l'on utilise un traitement simple ne considérant qu'une suspension monodisperse de taille égale au diamètre en nombre. Cependant, ce premier raisonnement ne tient compte que de l'intensité HRS. Pour déterminer $\langle d \rangle$, nous

utilisons également la concentration N qui est inversement proportionnelle au volume des particules. On peut montrer, en suivant des raisonnements similaires (cf annexe D), que la concentration calculée est surestimée si l'on ne tient pas compte de la dispersion. Au final, si l'intensité I et la concentration N sont toutes deux surestimées, les deux erreurs ont tendance à se compenser car $\langle d \rangle$ est proportionnel à I/N .

◊ **Calcul de $\langle d \rangle$ en prenant en compte la distribution en taille mesurée**

Ayant discuté de l'influence d'une distribution en taille des particules, on cherche ici à estimer l'erreur commise sur la valeur des coefficients optiques moyens. Le détail des calculs est présenté en Annexe D. Comme précédemment, nous calculons le coefficient $\langle d \rangle$ pour un traitement des données standard et pour un traitement polydisperse. Le traitement standard fait référence aux valeurs calculées de $\langle d \rangle$ avec la valeur moyenne en nombre déterminée par DLS. On note ces valeurs avec l'indice "Nb". Le traitement polydisperse nous permet de calculer un coefficient que l'on notera à l'aide de l'indice "poly".

Le tableau 3.3 rassemble les résultats obtenus, pour les mêmes suspensions que précédemment.

Tableau 3.3 – Erreurs approximatives liées à la distribution de taille sur $\langle d \rangle$.

Echantillons	D_{moy} [nm]	σ [nm]	$\frac{\langle d_{poly} \rangle}{\langle d_{Nb} \rangle}$ norm.	$\frac{\langle d_{poly} \rangle}{\langle d_{Nb} \rangle}$ log-norm.
KNbO ₃	128	31	0,77	0,67
LiNbO ₃ A	125	30	0,73	0,61
LiNbO ₃ B	132	36	0,67	0,50
KTP	237	76		

Ces calculs donnent une idée de l'erreur commise sur les coefficients moyens lorsque l'on considère la taille moyenne en nombre des nanoparticules plutôt que l'ensemble de la distribution. On peut en conclure que l'utilisation d'une valeur moyenne de taille en nombre a tendance à sur-estimer celle de $\langle d \rangle$. Cependant, l'erreur commise en assimilant les suspensions à des échantillons monodisperses est relativement faible, particulièrement lorsque les distributions en taille sont étroites.

◊ **Estimation de $\langle d \rangle$ pour une distribution en taille donnée**

Compte tenu de la dépendance du signal HRS en D^6 , similaire à l'intensité diffusée par la technique DLS, une idée a priori intéressante est d'utiliser le diamètre moyen en intensité pour calculer $\langle d \rangle$. Cependant, si ce diamètre moyen est pertinent pour déterminer correctement le signal moyen diffusé par les particules, ce n'est plus le cas lorsque l'on calcule la concentration. Nous présentons ici les valeurs de $\langle d \rangle$ obtenues à partir de trois calculs considérant la taille moyenne en nombre $\langle d_{Nb} \rangle$, la taille moyenne en intensité $\langle d_{Int} \rangle$, et la distribution de taille en nombre $\langle d_{poly} \rangle$. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.4 pour les quatre suspensions étudiées précédemment.

Tableau 3.4 – Comparaison des $\langle d \rangle$. Les tailles en intensité obtenues par DLS sont respectivement de 218 nm, 191 nm, 445 nm et 420 nm pour les suspensions de KNbO₃, LiNbO₃ A, LiNbO₃ B et KTP. Les distributions considérées sont de type log-normale.

Echantillons	$\frac{\langle d_{Int} \rangle}{\langle d_{poly} \rangle}$	$\frac{\langle d_{Nb} \rangle}{\langle d_{poly} \rangle}$
KNbO ₃	0,67	1,5
LiNbO ₃ A	0,36	1,5
LiNbO ₃ B	0,10	1,6
KTP	0,84	2,0

On constate que les valeurs obtenues en tenant compte de la distribution de taille sont comprises entre les coefficients calculés avec les tailles moyennes en nombre d'une part et en intensité d'autre part ($\langle d_{Int} \rangle < \langle d_{poly} \rangle < \langle d_{Nb} \rangle$).

Ainsi, en prenant en compte ces considérations, quelles sont les valeurs de taille les plus pertinentes pour la détermination des coefficients ONL moyens ? Dans l'analyse précédente, ou $\langle d_{poly} \rangle$ est supposé être la « vraie » valeur du coefficient, on constate que l'on obtient une valeur surestimée avec $\langle d_{Nb} \rangle$ et sous-estimée avec $\langle d_{Int} \rangle$. Cependant, il est important de noter que $\langle d_{poly} \rangle$ est déduit d'une mesure de la distribution en nombre par DLS qui possède aussi une certaine incertitude. Plus généralement, une des limites importantes de ces calculs provient de la présence d'agrégats dans les suspensions, impossibles à détecter et quantifier par DLS. Ces agrégats sont sans doute responsables d'une surestimation de la taille des particules mesurée et cela revient donc à sous-estimer le coefficient $\langle d \rangle$.

Par la suite, nous présenterons les résultats obtenus sur les différentes nanoparticules en montrant les 3 valeurs de $\langle d \rangle$ introduites précédemment, $\langle d_{Int} \rangle$, $\langle d_{poly} \rangle$, $\langle d_{Nb} \rangle$ afin de montrer l'incertitude de mesure associée aux problèmes de distribution de taille et d'aggrégation.

Conclusion

Dans cette partie, nous avons considéré les différentes sources d'erreurs susceptibles de fausser la mesure ou le résultat de la caractérisation HRS des particules. Face à ces problèmes potentiels, des solutions ont été proposées et appliquées dans l'objectif de quantifier ces erreurs.

La stabilité optique du système a été contrôlée et des mesures ont été prises de manière à réduire l'influence des fluctuations optiques du laser sur le signal. La présence aléatoire de signaux parasites extérieurs a également pu être atténuée grâce à la mise en place d'un hacheur de signaux. La sensibilité et la reproductibilité de la mesure HRS a ainsi été validée pour les échantillons étudiés. De plus, les artefacts optiques intrinsèques à ces échantillons (luminescence, sédimentation, absorption) ont été identifiés et écartés. La fiabilité de la référence utilisée a également été contrôlée.

Par ailleurs, des réflexions ont été menées sur les mesures de taille et de concentration. Ces caractérisations étant essentielles pour une analyse HRS rigoureuse, il a donc été nécessaire de s'assurer de leur pertinence. On a pu vérifier que la mesure DLS est suffisamment précise pour la majorité des échantillons étudiés, en particulier si ceux-ci sont préparés scrupuleusement selon la méthode de sédimentation présentée au chapitre 2. De plus, nous avons identifié et écarté les résultats DLS ne permettant pas une caractérisation correcte des particules. Les mesures de concentration nécessitent également un soin particulier. Nous avons ainsi défini les conditions de caractérisation donnant lieu à une incertitude de mesure sur la concentration qui reste tout à fait acceptable. Pour finir, une réflexion a été menée sur la distribution en taille des particules et leur incidence sur les résultats des coefficients moyens. L'erreur potentielle commise sur les coefficients moyens en raison de cette distribution a aussi été évaluée.

La mise en œuvre de ces différentes précautions permet d'aboutir à une détermination des coefficients ONL moyens des particules avec une bonne fiabilité. Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans la section suivante.

IV Résultats : coefficients moyens $\langle d \rangle$ et $\langle \beta \rangle$

L'exploitation des mesures optiques réalisées de manière systématique sur chaque type de nanoparticule a permis d'obtenir les coefficients $\langle \beta \rangle$ et $\langle d \rangle$ relatifs aux efficacités de GSH des particules et des matériaux, respectivement. Dans cette partie, les résultats sont d'abord présentés, puis analysés en s'appuyant sur les remarques précédentes.

Le tableau 3.5 regroupe les résultats expérimentaux. La première valeur de taille donnée dans ce tableau correspond à la taille représentative des différentes particules, déterminée à partir de plusieurs résultats DLS. Cependant, les coefficients moyens ont été calculés avec les tailles exactes des suspensions correspondantes, qui sont reportées dans les colonnes suivantes.

Les coefficients moyens $\langle d_{litt} \rangle$, issus des valeurs de la littérature mesurées sur des cristaux massifs, sont présentés en fin de tableau et les calculs sont explicités en annexe F. Ces valeurs sont notées ici à titre de comparaison et également comparées sur le graphique en figure 3.20.

Un exemple d'analyse a été présenté en début de ce chapitre pour le KNbO_3 . Pour les autres matériaux étudiés, les données expérimentales sont rassemblées en annexe E. Il n'y a pas de différence dans la démarche utilisée pour étudier les différents nanocristaux. Cependant, certaines particules sont plus

Tableau 3.5 – Coefficients moyens : résultats

	Taille [nm]			$\langle \beta \rangle$ [10^{-24} esu]	$\langle d \rangle$ [pm.V $^{-1}$]			$\langle d_{litt} \rangle$ [pm.V $^{-1}$]
	Typique	D_{Nb}	D_{Int}		$\langle d_{Int} \rangle$	$\langle d_{Nb} \rangle$	$\langle d_{poly} \rangle$	
BaTiO $_3$	110	91	135	5,16	1,9	5,5		14,1
KNbO $_3$	120	128	219	21,8	2,6	8,3	5,6	15,3
KTP	200	237	315	33,5	0,6	2,8	1,4	7,6
LiNbO $_3$	125	121	191	16,3	2,6	7,4	4,9	17,3
ZnO 90-200	130	132	203	7,12	0,7	2,5	1,2	2,8
ZnO 20	50	50	90	0,33	0,5	2,1		2,8

déliçates à caractériser que d'autres. Par exemple, nous avons constaté pour les particules de BaTiO $_3$ des problèmes de reproductibilité des mesures HRS, qui ont été résolus en abaissant la puissance du laser incident. Une hypothèse est un changement de structure induit par la température (température de Curie à 125°C) sous éclairçement. Les poudres de KTP étudiées sont assez polydisperses, ce qui complexifie la mesure de taille ainsi que l'interprétation de la mesure HRS puisque sa taille atteint la limite du régime de Rayleigh. Les mesures sur ZnO, KNbO $_3$ et LiNbO $_3$ sont les plus reproductibles.

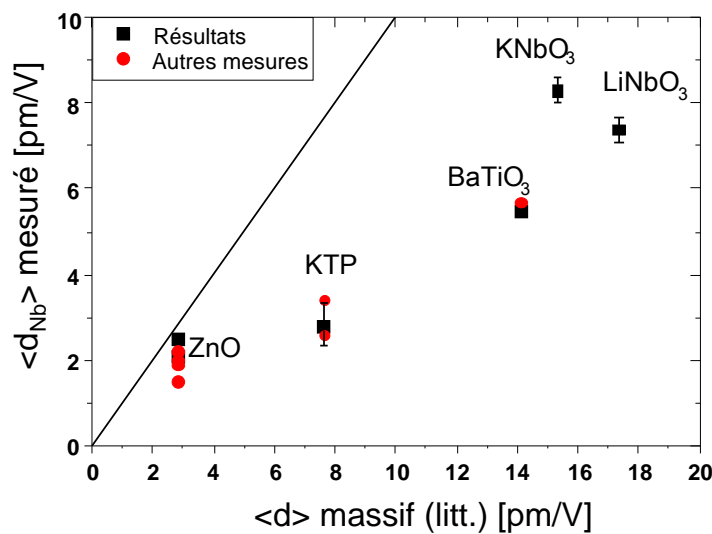


Figure 3.20 – Coefficients $\langle d \rangle$ mesurés comparés à ceux des cristaux massifs issus de la littérature. Résultats obtenus à l'issue de différentes mesures et erreurs prenant en compte la précision de la mesure DLS (par comparaison avec les données NTA) ainsi que la précision de la mesure de concentration par pesée

Les coefficients $\langle \beta \rangle$ caractérisent l'efficacité optique des particules, c'est-à-dire directement le signal détecté sous microscopie GSH par exemple, et dépendent aussi de la taille de celles-ci. Les valeurs d'hyperpolarisabilité varient de $0,3 \cdot 10^{-24}$ esu pour les plus petites particules (ZnO 20 - 50 nm) à $33,5 \cdot 10^{-24}$ esu pour les plus grandes (KTP - 238 nm). En revanche, les coefficients $\langle d \rangle$ caractérisent directement l'efficacité de GSH des matériaux dont sont constituées les particules. Ils peuvent ainsi être comparés aux coefficients des cristaux massifs, issus de la littérature. Nous obtenons des valeurs du même ordre de

grandeur, typiquement de quelques pm/V. On constate également que la "hiérarchie" entre les matériaux est plutôt bien respectée : les particules présentant les coefficients les plus élevés correspondent dans l'ensemble aux matériaux de plus fortes efficacités. Cependant, on remarque que pour un matériau donné, les particules ont un coefficient $\langle d \rangle$ deux à trois fois inférieur à celui des cristaux massifs. On peut supposer alors un décalage systématique. Nous présentons ici quelques éléments de réflexion autour de ce décalage :

- La méthode utilisée est basée sur une comparaison avec une référence externe qui est ici une solution de molécules de pNA. Or, les valeurs d'hyperpolarisabilité de cette molécule (de référence) sont assez dispersées dans la littérature, avec une difficulté supplémentaire provenant des différentes conventions utilisées. Nous avons utilisé la valeur d'hyperpolarisabilité issue de la référence [Huyskens 98], donnée pour la convention I comme abordé dans le chapitre 2.
- Il faut également rappeler que les valeurs de la littérature des matériaux massifs sont parfois mal connues et présentent également une certaine dispersion. Ce n'est cependant pas le cas pour le LiNbO_3 , bien étudié, et cela n'explique pas le décalage systématique observé.
- Une des hypothèses principales de notre démarche stipule que l'intensité diffusée de second harmonique est proportionnelle au carré du volume de la particule. Le décalage systématique observé pourrait être dû à une déviation par rapport à cette loi. Cependant, il est important de noter que les deux échantillons de ZnO , de même nature mais de tailles différentes, présentent les mêmes coefficients moyens $\langle d \rangle$, ce qui valide au premier ordre l'hypothèse initiale.
- Un point important, peu abordé jusqu'à présent, concerne la "qualité" cristalline des particules. Le signal HRS étant intimement relié à la structure non-centrosymétrique des nanocristaux, la présence d'impuretés ou de phases amorphes peut être responsable d'une diminution des coefficients mesurés. Une étude reliant justement paramètres d'élaboration, qualité cristalline et signal HRS sera abordée pour des nanoparticules de BiFeO_3 dans le dernier chapitre. Il est cependant difficile de proposer ce type d'approche pour l'ensemble des nanocristaux présentés : dans certains cas, nous ne disposons que d'un lot de particules par exemple, ou nous ne connaissons pas précisément tous les paramètres matériaux.
- Plus probablement, nous estimons que l'erreur systématique constatée pourrait être attribuée aux problèmes de mesures de taille des nanoparticules comme abordé tout au long de ce chapitre, en raison de la surestimation de la taille liée à la mesure du diamètre hydrodynamique, du modèle sphérique utilisé et de la présence d'agrégats dans les suspensions initiales. Par ailleurs, il est possible que la caractérisation soit faussée par la présence de particules polycristallines, agglomérats non orientés de petits nanocristaux. Le volume des particules détecté par DLS n'est alors pas le volume d'émission de GSH.
- De manière équivalente, on peut également se poser la question de l'existence de plusieurs domaines ferroélectriques dans une nanoparticule. On constate par exemple, que les coefficients obtenus pour le ZnO , seul matériau non ferroélectrique étudié, sont en très bonne adéquation avec la littérature.

Malgré ces différentes limites, nous estimons que notre démarche permet de caractériser les coefficients optiques non linéaires moyens avec une fiabilité acceptable. En particulier, cela permet une comparaison relative pertinente entre les différentes particules étudiées.

V Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons réalisé des mesures d'ensemble afin de déterminer l'hyperpolarisabilité moyenne $\langle \beta \rangle$ de nanoparticules et le coefficient $\langle d \rangle$ moyen des matériaux associés.

En discutant de la précision expérimentale de ces mesures, nous avons pu identifier différentes sources d'erreurs : stabilité des conditions expérimentales, phénomènes optiques parasites extérieurs ou propres aux échantillons, mesure de taille des nanoparticules et mesure de concentration des suspensions. Ces observations nous ont amené à considérer différentes précautions. Dans un premier temps, le soin apporté à la préparation des échantillons est primordial afin d'obtenir des suspensions les plus homogènes possibles. Cela entraîne une meilleure fiabilité des mesures DLS. D'autres précautions ont également été prises en considération concernant la mesure de concentration des suspensions, la qualité et la stabilité de la

référence utilisée pour la méthode de la référence externe ou encore la présence d'effets optiques issus de l'échantillon tels que la luminescence ou les effets de diffusion.

Malgré toutes ces précautions, il reste encore des verrous qui limitent la précision de ces mesures. On peut citer en particulier la difficulté de déterminer la taille de la particule cristalline "élémentaire", comme discuté précédemment.

Par ailleurs, on peut constater qu'il n'y a pas de différence importante d'une particule à l'autre en termes de coefficients optiques non linéaires. Dans ce cas, le signal GSH émis par une particule, c'est-à-dire le signal effectivement mesuré dans le cadre des applications de sondes harmoniques, est principalement relié au volume de la particule. Par exemple, un simple calcul d'ordre de grandeur montre qu'une particule de ZnO de 125 nm présente une émission de GSH équivalente à une particule de KNbO₃ de 80nm. Dans le cadre de ce projet, cela signifie que les propriétés optiques des particules ne sont pas nécessairement le seul facteur à considérer. D'autres critères, comme la stabilité chimique, la toxicité et la biocompatibilité en milieu biologique sont aussi à prendre en compte.

Détermination des coefficients indépendants d_{ij}

Introduction

Au chapitre précédent, nous avons déterminé les coefficients optiques moyens des particules. Afin d'approfondir l'étude de leurs propriétés optiques, nous cherchons à présent à déterminer les différents éléments du tenseur optique non linéaire de second ordre. Ces coefficients indépendants peuvent être mesurés en microscopie de GSH par des mesures résolues en polarisation [Brasselet 04, Long 07, Bonacina 07, Sandeau 07, Le Dantec 11]. Cependant, cette approche est basée sur une connaissance de l'orientation spatiale des cristaux. Si cela reste aisé sur des cristaux massifs, il en va autrement avec des nanoparticules uniques, dont l'orientation est difficile à évaluer. L'intérêt de la technique HRS pour ce type d'analyse réside dans le fait que ce sont des mesures d'ensemble, pour lesquelles toutes les directions cristallines sont considérées après moyennage. On évite ainsi les erreurs liées à l'estimation de l'orientation.

Au chapitre 2, nous avons vu que des mesures HRS résolues en polarisation permettent de déterminer les coefficients indépendants du tenseur ONL de second ordre sur des nanoparticules. Ici, nous nous intéressons à la validité des mesures expérimentales avant de présenter les résultats obtenus. Les effets de forme des particules seront abordés dans une seconde partie, avec l'étude de la réponse HRS en polarisation d'aiguilles d'iodate de fer.

I Mesures HRS résolues en polarisation

La méthode utilisée, détaillée au paragraphe II.3 du chapitre 2, consiste à mesurer le rapport de dépolarisation D_{pol} correspondant au rapport de deux intensités prises dans des conditions de polarisation spécifiées. A partir de cette valeur de D_{pol} , il est possible de retrouver le rapport de deux coefficients indépendants (généralement β_{31}/β_{33}) lorsque le tenseur ONL du matériau comporte deux composantes. Par ailleurs, le rapport D_{pol} peut également être mesuré sur des matériaux dont les tenseurs sont plus complexes et fournit alors une information partielle sur les cristaux considérés. Dans une démarche similaire au chapitre 3, nous présenterons en premier lieu la fiabilité expérimentale des mesures de rapport de dépolarisation. A partir de ces considérations, les résultats sont ensuite présentés pour différents matériaux et différents types de tenseurs.

I.1 Validité du protocole

Introduction

Différentes mesures effectuées sur des suspensions de ZnO dans l'éthanol ont mené à des valeurs de D_{pol} variant entre 0,37 et 0,45. On constate donc que les valeurs sont assez dispersées et nous avons cherché à en déterminer la raison.

Dans un premier temps, la reproductibilité des mesures effectuées avec notre système expérimental doit être vérifiée. Nous nous intéressons ensuite à certaines caractéristiques des suspensions telles que l'agrégation, la concentration et la polydispersité.

I.1.a Reproductibilité expérimentale

Des mesures résolues en polarisation sur une solution de pNA ont été réalisées à diverses reprises pendant plusieurs mois. La configuration expérimentale ainsi que la sensibilité d'acquisition sont les mêmes lors de chaque mesure. La figure 4.1 présente la variation du rapport de dépolarisation au cours du temps. Nos mesures donnent une valeur moyenne pour le pNA de $D_{pol}=0,232$ avec un écart-type de 0,007. Les variations de D_{pol} observées avec le pNA caractérisent donc la reproductibilité de notre système expérimental. Ici, les variations sont très probablement reliées à la présence d'offset non contrôlée.

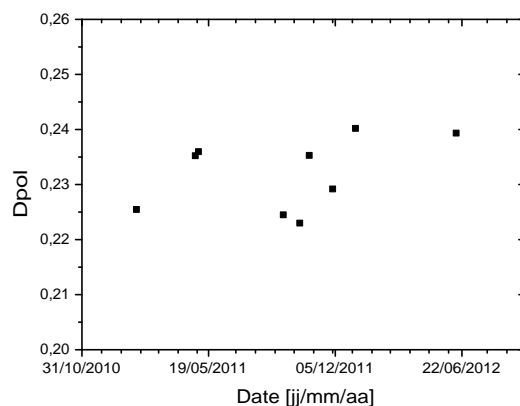


Figure 4.1 – Rapport de dépolarisation du pNA pour les mêmes acquisitions.

Il est donc important pour ce type de mesures, de traiter la présence d'offset avec une attention particulière. Dans ce contexte, la mise en place d'un système permettant de traiter les offsets en temps réel a permis d'améliorer notablement la fiabilité de ces mesures.

Par ailleurs, la valeur de D_{pol} de la littérature pour le pNA est de 0,225 [Heesink 93], en accord avec nos résultats expérimentaux. On constate ainsi la stabilité du système expérimental quant aux mesures de D_{pol} .

I.1.b Agrégation

Nous avons remarqué au chapitre précédent que l'agrégation n'avait pas d'effet particulier sur le signal HRS détecté. De la même manière, l'influence de ce phénomène sur le rapport de dépolarisation a été étudiée.

Les méthodes expérimentales sont les mêmes que celles présentées au paragraphe III.1.e (ch.3). Des suspensions de ZnO dans l'éthanol sont préparées puis étudiées sur plusieurs jours en termes de taille de particules et de mesures HRS résolues en polarisation. Le phénomène d'agrégation est observé par l'augmentation au cours du temps du diamètre moyen par DLS. Le rapport de dépolarisation est tracé en fonction de cette taille sur la figure 4.2. On remarque ainsi que l'agrégation des particules ne modifie pas le rapport de dépolarisation.

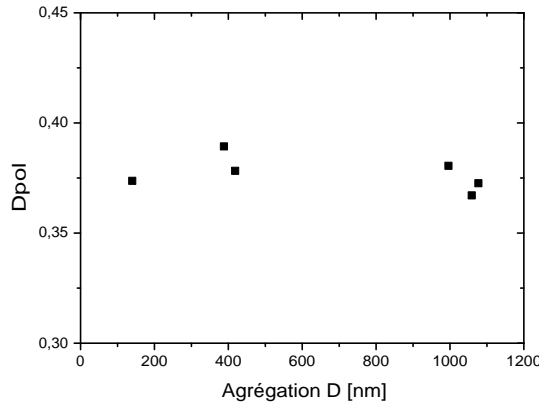


Figure 4.2 – Evolution du rapport de dépolarisation avec l'agrégation.

I.1.c Taille et polydispersité

Ici, nous tentons de définir l'influence des paramètres de taille et de polydispersité des suspensions sur le rapport de dépolarisation. Pour cela, nous avons mesuré D_{pol} sur différentes suspensions de ZnO. Les suspensions préparées indépendamment l'une de l'autre présentent bien sûr une taille moyenne et une polydispersité différentes. Une première analyse consiste à observer le rapport de dépolarisation en fonction de la taille moyenne des suspensions. Comme on peut le constater sur la figure 4.3, aucune tendance ne ressort. Le même type d'analyse a été réalisé à partir des tailles en intensité mais ne permet pas non plus d'expliquer les variations de D_{pol} observées.

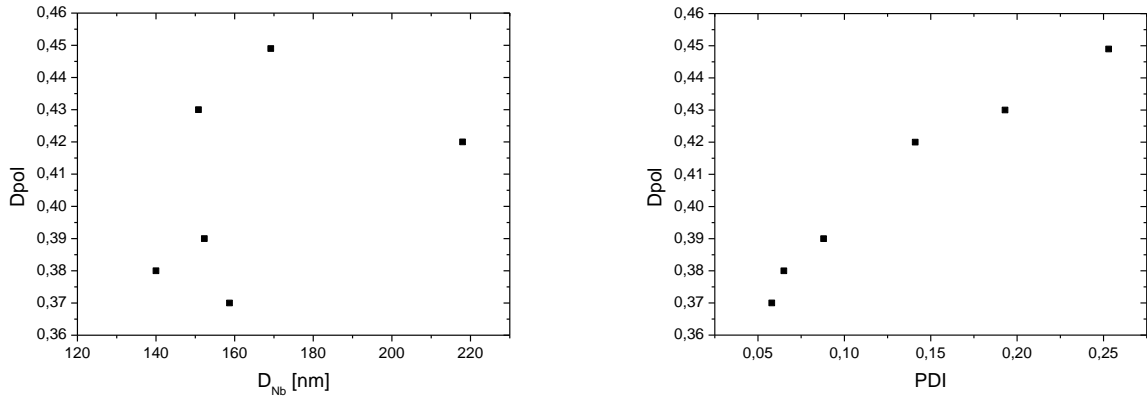


Figure 4.3 – Rapport de dépolarisation en fonction des paramètres de taille et de polydispersité des échantillons.

On cherche maintenant étudier l'influence de la polydispersité des suspensions sur le rapport de dépolarisation, la polydispersité étant issue des mesures DLS.

Il est important de noter que nous cherchons à déterminer l'effet de la polydispersité "réelle" des suspensions. Or, la présence éventuelle d'agrégats dans les suspensions ne nous permet malheureusement pas de mesurer précisément ce dernier paramètre par DLS et constitue certainement une limite aux résultats présentés. Ici, l'observation sur la figure 4.3 de l'augmentation du rapport de dépolarisation avec la polydispersité est donc à interpréter avec précaution. Cependant, ce résultat est en accord avec les observations faites sur de nombreuses mesures réalisées au cours de cette thèse. En effet, nous avons

constaté une certaine corrélation entre l'état de dispersion des échantillons et le rapport de dépolarisation. En pratique, les échantillons que nous estimions polydisperses ¹ présentaient une valeur du paramètre Dpol plus élevée que les "bons" échantillons.

On estime alors raisonnablement que les résultats issus de suspensions préparées avec soin, impliquant une plus faible polydispersité, ont tendance à être plus fiables. D'autre part, nous estimons également que la dispersion des mesures sur Dpol pour un même type de nanoparticules (comme celle présentées ici sur ZnO) peut être partiellement due à ces problèmes.

I.1.d Effets de la concentration

Pour certaines mesures, il est apparu que le rapport de dépolarisation variait avec la concentration des suspensions, tous les autres paramètres étant fixés. Des mesures en polarisation ont donc été effectuées après dilutions d'une suspension initiale. Des suspensions de KNbO_3 , KTP et LiNbO_3 , de concentration initiale $N_{\text{KN-A}}=2,04.10^{10} \text{ cm}^{-3}$, $N_{\text{LN}}=3,86.10^{10} \text{ cm}^{-3}$ et $N_{\text{KTP}}=8,25.10^9 \text{ cm}^{-3}$. La concentration de la suspension KN-B est inconnue mais est du même ordre de grandeur que celle de KN-A. La figure 4.4 montre l'évolution du rapport de dépolarisation en fonction de la concentration relative pour ces trois suspensions.

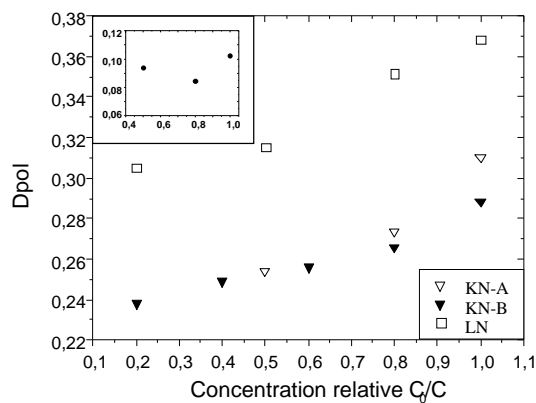


Figure 4.4 – Rapport de dépolarisation en fonction de la concentration pour des suspensions de KNbO_3 , LiNbO_3 et de KTP (en encart) .

On remarque une légère augmentation du rapport de dépolarisation, de 0,24 à 0,28 pour les particules de KNbO_3 par exemple. Cette tendance n'est cependant pas observée pour la suspension de KTP, dont la concentration absolue est nettement inférieure aux deux autres. Il semble donc que l'influence de la concentration sur le rapport de dépolarisation soit observable que pour des concentrations relativement élevées. Notons ici qu'aucun effet notable de diffusion n'a été observé sur ces échantillons (cf. § III.1.g).

En comparaison, et comme on l'a vu au paragraphe I.1.a, les variations propres au système expérimental sont nettement plus faibles et ne peuvent expliquer ce phénomène. L'influence de la concentration pourrait expliquer la dispersion des résultats observés en début de cette partie. La faible variation obtenue pour l'échantillon de plus faible concentration semble indiquer que les mesures sont plus fiables dans ce cas.

Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté les variations expérimentales du rapport de dépolarisation de suspensions de nanoparticules, variations qui ne peuvent être expliquées par un simple problème de reproductibilité du banc expérimental. Nous avons montré que l'aggrégation des particules n'influençait

1. Les échantillons estimés comme polydisperses sont des suspensions qui ont peu sédimenté par exemple.

pas ou peu la mesure de D_{pol} . Nous avons par contre constaté, de manière empirique, une augmentation de D_{pol} avec la concentration. Nous observons également une augmentation avec la polydispersité des suspensions. Ces observations restent pour le moment assez délicates à interpréter. Après avoir éliminé les explications les plus simples, liées à des erreurs de mesures par exemple, nous ne pouvons malheureusement pas proposer d'hypothèses satisfaisantes et des études complémentaires sont nécessaires. Néanmoins, par cette étude, nous estimons que la fiabilité des mesures est améliorée lorsque les échantillons sont plutôt monodisperses et assez faiblement concentrés.

I.2 Rapport de dépolarisation des différentes nanoparticules

A présent, nous allons présenter les différentes mesures réalisées. On rappelle les conditions expérimentales dans lesquelles ces mesures ont été réalisées : le faisceau incident est polarisé linéairement et l'on fait varier la direction de polarisation à l'aide d'une lame demi-onde. De cette façon, on obtient des courbes en fonction de l'angle de polarisation incident, dont les ajustements permettent de retrouver directement les coefficients $\langle \beta_{XXX} \rangle$ et $\langle \beta_{ZZX} \rangle$.

I.2.a Tenseur "simple"

Nous allons présenter dans un premier temps les études réalisées sur les nanocristaux de ZnO et BaTiO₃, qui ont un tenseur d_{ij} simple avec seulement deux coefficients indépendants non nuls, d_{31} et d_{33} . La figure 4.5 montre les graphes polaires de l'intensité HRS totale $I_X + I_Z$ (détectée sans analyseur) en fonction de l'angle de polarisation. L'analyse des courbes donne les valeurs de $\langle \beta_{XXX}^2 \rangle$ et $\langle \beta_{ZZX}^2 \rangle$ (en unités arbitraires). Le rapport de dépolarisation D_{pol} est ensuite calculé en utilisant l'équation 2.26. On trouve une valeur de $D_{pol}=0,36$ pour le BaTiO₃ et $D_{pol}=0,37$ pour le ZnO.

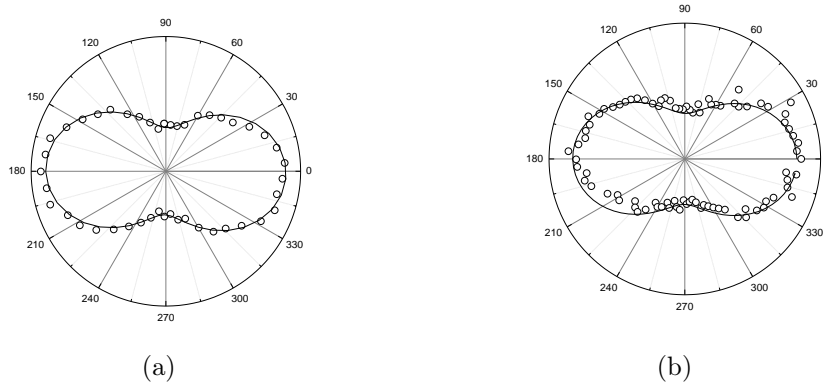


Figure 4.5 – Intensité HRS résolue en polarisation pour (a) BaTiO₃ et (b) ZnO.

Comme abordé au chapitre 2, on peut alors remonter au rapport des deux coefficients $R = \beta_{31}/\beta_{33}$ en utilisant l'équation 2.42. Par simple lecture graphique de la courbe $D_{pol} = f(R)$, on trouve ainsi deux valeurs de R pour le ZnO par exemple (figure 4.6). Les résultats sont reportés dans le tableau 4.1.

Comme dans le chapitre précédent, nous pouvons comparer ces résultats avec les valeurs issues de la littérature, c'est-à-dire obtenues sur des matériaux massifs. Pour le ZnO, en tenant compte de l'incertitude expérimentale discutée précédemment, l'écart est relativement faible (0,37 mesuré pour 0,29 selon la littérature). D'autre part, pour le paramètre R , la comparaison avec les valeurs de la littérature permet de sélectionner la valeur la plus probable, ici $R=-0,17$ qui s'approche de celle d'un cristal massif [Wang 01] mesuré à $R=-0,095$. En revanche, les valeurs de D_{pol} pour le BaTiO₃ sont plus éloignées par rapport à la littérature [Nikogosyan 05] et ne nous permettent pas de sélectionner un coefficient R plutôt qu'un autre.

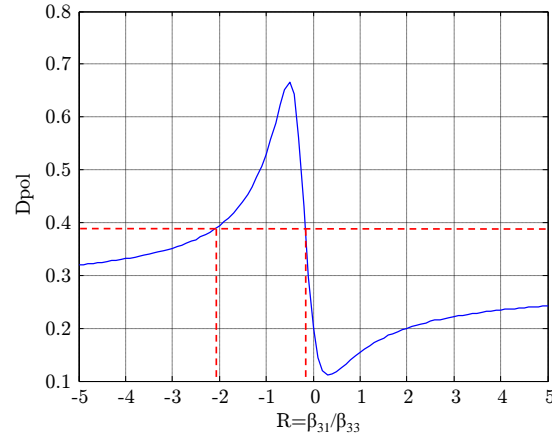


Figure 4.6 – Détermination du facteur R à partir du rapport de dépolarisation pour le ZnO.

Tableau 4.1 – Rapports de dépolarisation expérimentaux des nanocristaux et de cristaux massifs.

	D_{exp}	D_{litt}	R_{exp}	R_{litt}	Référence
BaTiO ₃	0,36	0,21	-0,15 -2,72	2,55	[Nikogosyan 05]
ZnO	0,37	0,292	-2,1 -0,17	-0,095	[Wang 01]

I.2.b Tenseur "complexe"

Par ailleurs, des mesures résolues en polarisation ont également été effectuées sur les autres types de particules étudiées, qui possèdent un tenseur d_{ij} avec plus de deux coefficients indépendants non nuls. Les graphes en polarisation sont présentés figure 4.7 pour des nanocristaux de KNbO₃, KTP et LiNbO₃. Contrairement à l'analyse précédente, le rapport R ne peut pas être déterminé mais la comparaison entre le rapport de dépolarisation des nanoparticules et du matériau massif est toujours pertinente (tableau 4.1). On constate un écart assez important, excepté pour les particules de KTP

Tableau 4.2 – Rapports de dépolarisation expérimentaux des nanocristaux et de cristaux massifs.

	D_{exp}	D_{litt}	Référence
KNbO ₃	0,25	0,13	[Shoji 97]
KTP	0,13	0,12	[Shoji 97]
LiNbO ₃	0,32	0,13	[Volk 09]

Discussion

Les valeurs du rapport de dépolarisation des nanocristaux sont assez éloignées des valeurs issues de matériaux massifs, et cela même en considérant les incertitudes de mesure. D'une part, on peut rappeler que les données de la littérature sont parfois différentes selon les références, ce qui prouve que ce type de détermination n'est pas triviale, que ce soit pour les cristaux massifs ou pour des nanocristaux.

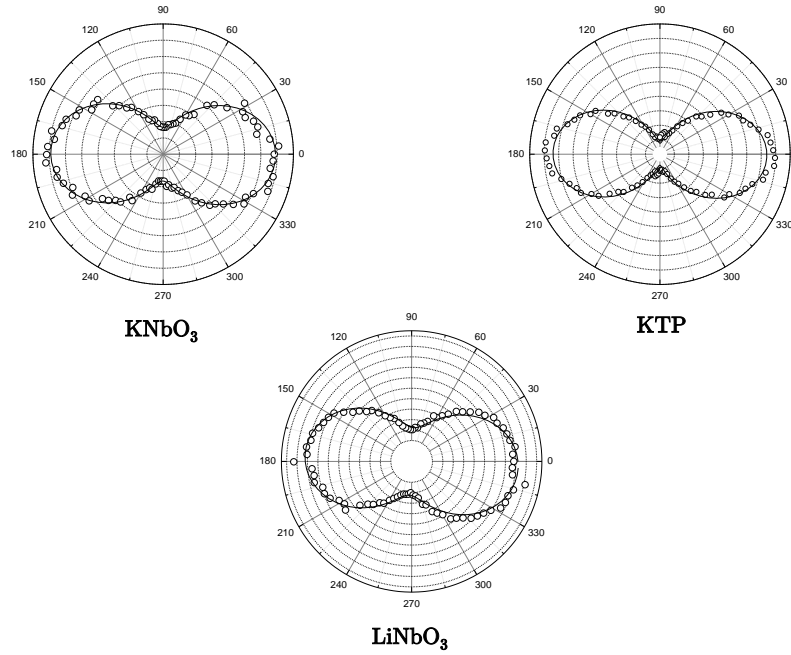


Figure 4.7 – Intensité résolue en polarisation pour le KNbO_3 , le KTP et le LiNbO_3 .

D'autre part, il faut garder à l'esprit les limites de cette comparaison. Nous avons jusqu'à présent supposé, puis démontré que les propriétés de second harmonique des nanocristaux étaient principalement reliées à leur structure cristalline. Cependant, il n'est pas surprenant d'observer des déviations sur un paramètre tel que le rapport de dépolarisation. On peut supposer des effets liés à la forme des particules. Le champ électrique interne (eqn. 2.32) peut alors être modifié et induire une réponse en polarisation particulière pour des structures de types nanofils [Ruda 07]. Une autre hypothèse plausible concerne des déformations de la maille cristalline des particules liées à des contraintes mécaniques internes dues au procédé de fabrication (étapes de broyage pour KNbO_3 et LiNbO_3 alors qu'il n'y a pas de traitement mécanique pour KTP). Dans la partie suivante, nous allons justement montrer que des variations importantes du rapport de dépolarisation peuvent être observées sur un même type de nanoparticules, lorsque leur forme et leur dimension sont modifiées.

II Effets de forme des particules : croissance d'aiguilles d'iodate de fer

Nous avons discuté précédemment des effets de l'aggrégation, de la concentration et de la polydispersité sur les mesures résolues en polarisation. Maintenant, nous allons nous intéresser à l'influence de la forme des particules sur ces mesures.

L'iodate de fer ($\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$) est un autre matériau dont les propriétés ONL d'ordre 2 permettent d'envisager son application en imagerie biomédicale, d'autant plus que sa toxicité est a priori faible. Dans ce cadre, la synthèse de nanocristaux d'iodate de fer a été développée au laboratoire [El Kass 12]. La technique HRS a été utilisée afin de réaliser un suivi *in situ* et temps réel de la croissance des cristaux [Mugnier 11]. Parmi les différentes conditions de synthèse testées, certaines ont donné lieu à la formation d'aiguilles (ou nanobâtonnets) cristallines. C'est ce que nous allons étudier dans cette partie.

II.1 Croissance d'aiguilles d'iodate de fer

II.1.a Synthèse de nanoparticules en microémulsion

Les nanocristaux d'iodate de fer peuvent être synthétisés par voie micellaire. Cela signifie que les réactifs sont solubilisés dans des gouttelettes d'eau, lesquelles sont stabilisées dans une solution organique grâce à la présence d'un tensioactif. La taille des micelles inverses ainsi formées est contrôlée par la proportion de tensioactif par rapport à la phase aqueuse. Lorsqu'il y a une grande quantité de tensioactif, toute l'eau des gouttelettes est immobilisée par l'hydratation des têtes polaires et les micelles sont de taille nanométrique. Dans notre cas, la quantité de tensioactif est relativement faible, ce qui implique la présence d'eau "libre" au cœur de micelles plus grosses (de taille typique 6-10 nm), et l'on parle alors de microémulsion.

Les réactifs, l'acide iodique et le nitrate de fer, sont d'abord solubilisés séparément en phase aqueuse puis mélangés, toujours séparément, à une solution organique contenant de l'AOT comme tensioactif. Après agitation, on obtient ainsi deux microémulsions, l'une contenant des ions IO_3^- et l'autre des ions Fe^{3+} . Lors du mélange de ces deux microémulsions, la collision des micelles entraîne la formation de dimères au sein desquels se produit une réaction de précipitation entre IO_3^- et Fe^{3+} donnant lieu à la formation de particules d'iodate de fer, $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$.

II.1.b Suivi *in situ* de la cinétique de croissance en HRS

Afin de suivre l'évolution de la réaction au cours du temps, la technique HRS a été utilisée dans le but de détecter l'apparition des premiers cristaux non-centrosymétriques. Ils génèrent un signal de second harmonique qui augmente avec le volume des particules.

A titre d'exemple, la microémulsion testée ci-dessous est réalisée à partir de deux solutions micellaires à $W=[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]=6$. Celles-ci sont obtenues à partir de solutions aqueuses d'acide iodique $[\text{IO}_3^-]=0,3$ M et de nitrate de fer $[\text{Fe}^{3+}]=0,1$ M. L'AOT est dissout à 0,2 M dans l'isooctane. A $t=0$, les deux solutions micellaires sont mélangées et la microémulsion est maintenue à 80°C pendant toute la durée de la réaction, de manière à augmenter la cinétique de formation des cristaux.

Des quantités de 4 mL sont ensuite prélevées régulièrement de la microémulsion mère et analysées en HRS dans les mêmes conditions expérimentales. Le signal ainsi détecté est représenté en fonction du temps sur la figure 4.8. On remarque que l'intensité, nulle au début, augmente à partir d'un temps appelé temps de cristallisation qui est mesuré ici à 11 min. Le signal augmente ensuite de manière quasi-linéaire avant de se stabiliser à un palier, indiquant la fin de la réaction. Il a été observé que les cinétiques de cristallisation ainsi obtenues sont reproductibles et que la vitesse de réaction augmente avec la température et la concentration en réactifs et AOT.

II.1.c Mécanisme de croissance des aiguilles d'iodate de fer

En parallèle, des mesures DLS et de l'imagerie MET (fig. 4.9) ainsi que des mesures DRX (fig. 4.8 (encart)) réalisées à partir des prélèvements correspondants aux points A, B, C et D, ont permis de mieux comprendre le mécanisme de formation de ces cristaux d'iodate de fer, comme illustré figure 4.10.

Tout d'abord, la réaction initiale produit des particules d'iodate de fer sphériques et essentiellement amorphes qui ont tendance à s'agréger (A). Ces agrégats organique-inorganique, non stables, se réorganisent et la cristallisation commence (B). La croissance de structures unidimensionnelles de type aiguilles (C et D) indique que la cristallisation et/ou l'aggrégation de particules se fait de manière orientée, ce qui peut s'expliquer par une adsorption préférentielle du surfactant (ou tensioactif) sur certaines faces cristallographiques. Les cristaux obtenus par cette voie présentent un diamètre transversal d'environ 15 nm et des longueurs variables entre 50 nm et 2 μm , dans la direction de l'axe cristallographique c. En raison de cette croissance unidimensionnelle, il semble compromis dans l'immédiat de les utiliser en tant que marqueurs biologiques pour l'imagerie, mais il est intéressant d'étudier de telles particules en HRS.

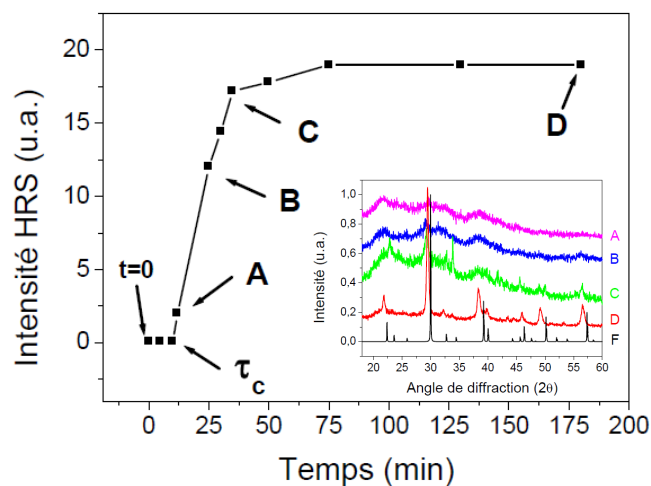


Figure 4.8 – Evolution du signal HRS en fonction du temps pour une microémulsion à $W=6$, $[AOT]=0,2$ M, $[IO_3^-]=0,3$ M et $[Fe^{3+}]=0,1$ M. (En encart) Diagramme DRX (Co, $K\alpha$) des nanopoudres obtenues par centrifugation des échantillons A, B, C et D. F représente le diagramme de référence (ICSD 154674) de l'iodate de fer. *Extrait de [El Kass 12].*

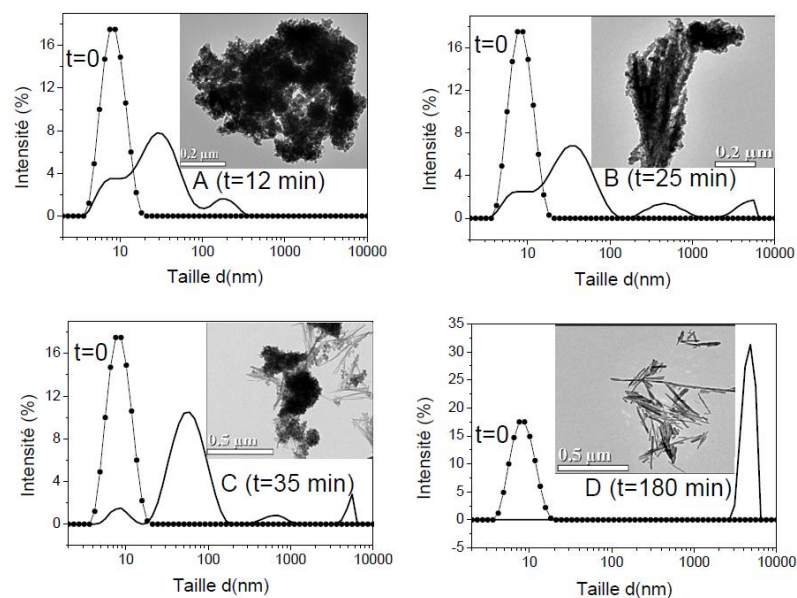


Figure 4.9 – Comparaison des spectres DLS avant centrifugation et d'images MET après centrifugation des échantillons A, B, C et D. *Extrait de [El Kass 12].*

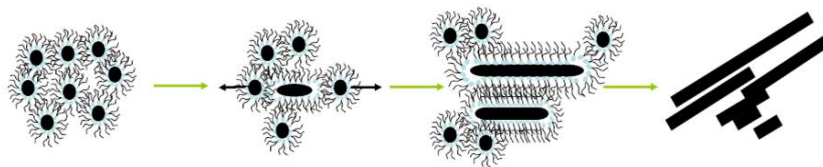


Figure 4.10 – Mécanisme de croissance proposé pour la formation des nanobâtonnets de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ dans le système (AOT/alcane/eau). *Extrait de [El Kass 12, Ladj 12].*

II.2 Évolution du rapport de dépolarisation pendant la croissance d'aiguilles

II.2.a Méthodes

La synthèse par voie micellaire s'effectue à partir de microémulsions dont les compositions sont les mêmes que celles présentées au paragraphe II.1.b. À $t=0$, on mélange ces deux solutions à une température d'environ 60°C à 80°C pour accélérer la réaction. Des échantillons de cette microémulsion sont ensuite prélevés à intervalles réguliers puis analysés par HRS. De cette manière, il est possible de déterminer le signal de second harmonique émis par la solution au cours de la formation des particules. Les mesures effectuées sont résolues en polarisation, ce qui fournit également des informations sur le rapport de dépolarisation des cristaux pendant la croissance.

II.2.b Mesures optiques

Sur la figure 4.11, on peut voir l'évolution du signal HRS d'une microémulsion d'iodate de fer pour une température de 60°C . On retrouve les caractéristiques observées précédemment, à savoir une augmentation relativement rapide suivie par un palier correspondant à la fin de la réaction.

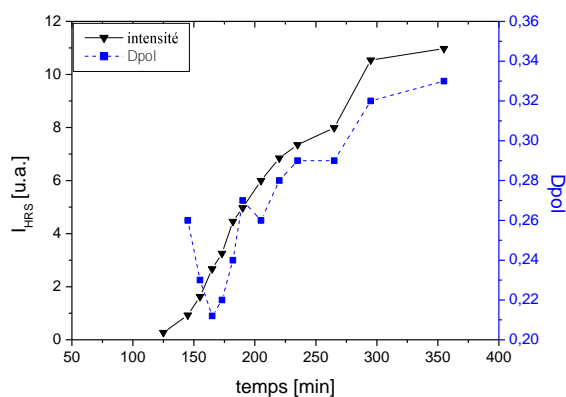


Figure 4.11 – Evolution de l'intensité HRS et du rapport de dépolarisation d'une microémulsion lors de la croissance d'aiguilles de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$.

L'augmentation du signal HRS a été expliquée précédemment. Au début de la réaction, il n'y a encore aucune particule de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ formée donc le signal est nul. De plus, la phase de nucléation lors de la synthèse micellaire entraîne la formation de particules amorphes qui ne peuvent donc pas diffuser de GSH. Par la suite, les particules commencent à cristalliser et croître, entraînant l'augmentation du nombre de particules d'une part mais également l'augmentation du volume cristallin de chaque particule d'autre part. Ces deux paramètres sont à l'origine de l'augmentation du signal HRS. À la fin de la réaction, il n'y a plus ni cristallisation ni croissance et le signal se stabilise.

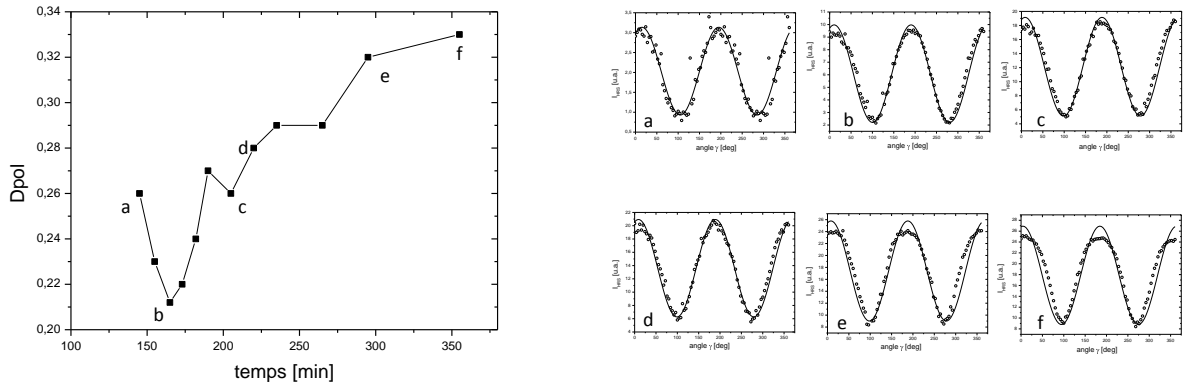


Figure 4.12 – Evolution du rapport de dépolarisation lors de la synthèse d’aiguilles de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ et courbes de polarisation pour les prélèvements *a* à *f* de la solution mère.

Si l’on observe maintenant le rapport de dépolarisation au cours de la croissance (fig. 4.11), on remarque également une évolution significative de cette grandeur. Or, la nature cristalline est toujours la même et l’on peut supposer un effet relié à la taille et à la forme des particules.

Sur la figure 4.12, on présente l’évolution de ce rapport de dépolarisation ainsi que les courbes HRS relatives à certains prélèvements de la solution mère. En début de réaction (prélèvement *a*), on constate que le signal est assez bruité mais présente une nette variation d’intensité avec la polarisation incidente. Cela permet de confirmer la valeur de D_{pol} obtenue ici et la diminution de ce rapport pendant les premières minutes de la réaction ($t=125$ à $t=160$ min). Dans un second temps, on observe une augmentation de D_{pol} , validée par la qualité de l’acquisition HRS sur cette période. En fin de réaction (prélèvements *e* et *f*), l’observation attentive des courbes montre une déviation de la réponse en polarisation par rapport à la forme habituelle, qui n’est pas liée à un problème d’acquisition. De ce fait, les deux derniers points de la courbe doivent être considérés avec précaution.

Ces mesures ont été reproduites plusieurs fois et la même tendance a été observée. Comme on l’a vu précédemment, le mécanisme de cristallisation des particules d’iodate de fer implique une croissance en forme d’aiguilles. On propose ici de s’intéresser à l’effet provoqué par l’augmentation de la longueur des cristaux dans la direction de l’axe polaire.

II.3 Modélisation de la GSH dans une particule longiligne

II.3.a Hypothèses

Une modélisation de la réponse HRS sur des structures filiformes a été récemment proposé afin de mieux comprendre les propriétés de second harmonique d’une protéine, le collagène [Deniset-Besseau 09]. Le collagène joue un rôle important dans de nombreux phénomènes biologiques tels que la réparation des tissus endommagés. Grâce à ses propriétés ONL, il est possible d’étudier de manière non invasive par microscopie de GSH les mécanismes biologiques mis en jeu. Dans ce cadre, l’efficacité de GSH de différents types de collagène a été étudiée en HRS. Il est apparu que certains types de collagène de structure fibrillaire présentaient une réponse HRS bien supérieure à celle attendue à partir des faibles efficacités optiques de ses molécules constitutives. Une hypothèse permettant d’expliquer cette réponse HRS élevée consiste à considérer la sommation cohérente des signaux HRS émis par chaque molécule le long des chaînes de collagène, impliquant une augmentation du signal évidente par rapport à une sommation incohérente de chaque molécule.

Afin de vérifier cette hypothèse, le modèle a été développé en tenant compte de la propagation des champs incident et à fréquence double le long des chaînes de molécules. Ce formalisme a permis de simuler la réponse HRS des chaînes de collagène en fonction de leur longueur. Les résultats ainsi obtenus montrent

que l'hyperpolarisabilité optique "efficace" d'une telle structure filiforme augmente avec sa longueur et confirme l'hypothèse d'amplification cohérente du signal émis à la fréquence double le long de telles chaînes.

Nous reprenons ici le formalisme développé dans cette étude en l'appliquant aux cristaux d'iodate de fer.

II.3.b Formalisme

Le formalisme initialement développé par [Deniset-Besseau 09] pour étudier l'intensité HRS globale des chaînes de collagène en fonction de leur longueur est ici repris et adapté de manière à pouvoir déterminer le rapport de dépolarisation en fonction de la longueur des cristaux.

Le modèle est basé sur le principe selon lequel chaque élément δL de la chaîne émet une onde de second harmonique $\delta E(2\omega)$ qui dépend des hyperpolarisabilités $\delta\beta_{IJK}$ et du champ incident $E(\omega)$. Par exemple, pour une mesure avec une polarisation incidente verticale et un analyseur vertical, on obtient donc la contribution $\delta E(2\omega)$:

$$\delta \vec{E}_{XXX}(2\omega) \propto \delta\beta_{XXX} E(\omega)^2 \quad (4.1)$$

La détermination du rapport de dépolarisation est effectuée au moyen de deux mesures réalisées avec analyseur vertical : la première pour une polarisation incidente verticale (selon X dans le repère du laboratoire, fig. 2.4) et la seconde pour une polarisation incidente horizontale (selon Y). On rappelle l'équation générale 2.18 donnant l'intensité détectée avec un analyseur vertical en fonction de la polarisation γ .

$$I_X = GNFI_\omega^2 (<\beta_{XXX}^2> \cos^4\gamma + <\beta_{XXY}^2> \sin^4\gamma + (4<\beta_{XXY}^2> + 2<\beta_{XXX}\beta_{XXY}>) \cos^2\gamma \sin^2\gamma) \quad (4.2)$$

Le rapport de dépolarisation s'écrit :

$$D_{pol} = \frac{<\beta_{XXY}^2>}{<\beta_{XXX}^2>} \quad (4.3)$$

On peut noter une différence par rapport à l'équation 2.26 qui était obtenue après les simplifications propres aux hypothèses d'approximation dipolaire et d'émission incohérente [Brasselet 98].

Les contributions $\delta E_{XXX}(2\omega)$ et $\delta E_{XXY}(2\omega)$ s'écrivent :

$$\delta E_{XXX}(2\omega) \propto \delta\beta_{XXX} E(\omega)^2 \quad (4.4)$$

$$\delta E_{XXY}(2\omega) \propto \delta\beta_{XXY} E(\omega)^2 \quad (4.5)$$

Afin de prendre en compte la propagation du champ incident le long des cristaux, on repère l'orientation de ceux-ci par les angles d'Euler définis dans la figure 2.3, l'axe z correspondant à l'axe cristallographique c. Ici, les cristaux sont symétriques par rapport à l'angle ψ donc ce dernier n'est pas pris en compte. On a alors :

$$E(\omega) = E_0(\omega) e^{i(\vec{k}_\omega \vec{z})} \quad (4.6)$$

avec $\vec{k}_\omega \vec{z} = k_\omega \vec{Z} \cdot \vec{z} = k_\omega z \cos \theta$.

Le champ électrique généré à la fréquence double se propage également à travers les aiguilles. Par intégration des contributions des différents éléments δL de la chaîne, on obtient le champ à 2ω rayonné par une aiguille en fonction de son orientation dans l'espace.

$$E(2\omega) = \int_0^L \delta E(2\omega) e^{-i\vec{k}_{2\omega} \vec{z}} dz \quad (4.7)$$

La direction de détection s'effectuant perpendiculairement à la propagation du champ incident, selon Y, on a $\vec{k}_{2\omega} \vec{z} = k_{2\omega} \vec{Y} \cdot \vec{z} = k_{2\omega} z \sin \theta \sin \phi$

Prenons par exemple, le champ détecté pour une polarisation incidente verticale et avec analyseur vertical. En considérant $n_\omega \approx n_{2\omega}$, on obtient :

$$E_X(2\omega) \propto \delta\beta_{XXX} L \text{sinc} \left(\frac{k_{2\omega} L}{2} (\cos \theta - \sin \phi \sin \theta) \right) E_0(\omega)^2 \quad (4.8)$$

soit l'intensité correspondante :

$$I_{XXX} = GNF \langle \delta\beta_{XXX}^2 L^2 \text{sinc}^2 \left(\frac{k_{2\omega} L}{2} (\cos \theta - \sin \phi \sin \theta) \right) \rangle I_\omega^2 \quad (4.9)$$

Comme on l'a vu au chapitre 2, l'obtention du signal HRS pour plusieurs aiguilles fait appel à l'intégration de l'orientation des particules dans toutes les directions. On utilise alors l'expression des $\delta\beta_{IJK}$ en fonction des $\delta\beta_{ij}$ du matériau et des angles d'Euler, obtenu par l'équation 2.6. L'intensité détectée selon X devient alors :

$$I_{XXX} \propto L^2 \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \delta\beta_{XXX}^2(\theta, \phi, \beta_{ij}) S^2 d\phi \sin \theta d\theta \quad (4.10)$$

avec $S = \text{sinc} \left(\frac{k_{2\omega} L}{2} (\cos \theta - \sin \phi \sin \theta) \right)$.

De la même manière, on obtient l'intensité I_{XYX} correspondant à la mesure avec polarisation incidente horizontale. Après avoir effectué la moyenne orientationnelle dans toutes les directions pour chacune de ces intensités, on obtient le rapport de dépolarisation en fonction de la taille L des cristaux. On peut écrire ce rapport sous la forme :

$$D_{pol} = \frac{I_{XYX}}{I_{XXX}} = \frac{\int_0^\pi \int_0^{2\pi} \delta\beta_{XYX}^2(\theta, \phi, \beta_{ij}) S^2(L) d\phi \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi \int_0^{2\pi} \delta\beta_{XXX}^2(\theta, \phi, \beta_{ij}) S^2(L) d\phi \sin \theta d\theta} \quad (4.11)$$

II.3.c Application aux aiguilles d'iodate de fer

Le tenseur ONL de second ordre du $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$, présenté dans le tableau 1.2, ne possède que deux coefficients indépendants pour les conditions de Kleinman : β_{31} et β_{33} . On introduit ici le rapport des coefficients $\delta\beta_{ij}$: $u = \frac{\delta\beta_{31}}{\delta\beta_{33}}$. On reporte l'expression des coefficients β_{IJK} en fonction des angles d'Euler et de ce rapport u :

$$\beta_{XXX} = (3u(1 - \sin^2 \theta \cos^2 \phi) + \cos^2 \phi \sin^2 \theta) \sin \theta \cos \phi \quad (4.12)$$

$$\beta_{XYX} = ((3 \sin^2 \theta \cos^2 \phi + 3 \cos^2 \theta - 2)u + 1 - \sin^2 \theta \cos^2 \phi - \cos^2 \theta) \sin \theta \cos \phi \beta_{33} \quad (4.13)$$

Les coefficients d_{ij} de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ ne sont pas connus pour des cristaux massifs en raison de la difficulté à obtenir des monocristaux de grande taille de ce matériau. La simulation est donc effectuée pour différentes valeurs de rapports de u . L'indice de réfraction de l'iodate de fer utilisé est $n=1,8$ et les longueurs d'ondes correspondent aux longueurs d'ondes expérimentales, à savoir 1064 nm et 532 nm. A partir de ces valeurs, on obtient la courbe $D_{pol} = f(L)$, présentée figure 4.13.

On observe ici que le rapport de dépolarisation tend à diminuer avec la croissance d'aiguilles d'iodate de fer pour des rapports u inférieurs à 0,3. A l'inverse, pour des rapports supérieurs, tels que $u = 1$, on observe la tendance contraire, avec une augmentation de D_{pol} lorsque la longueur des aiguilles augmente.

Par comparaison, la variation expérimentale du rapport de dépolarisation en fonction du temps montre une diminution dans les tout premiers stades, de 125 à 160 min, suivie d'une augmentation et d'un plateau à la fin de la réaction vers 300-350 min. Dans cette seconde partie, le paramètre D_{pol} augmente de 0,21 à 0,32.

On sait qu'en début de réaction, les nanoparticules d'iodate de fer sont plutôt amorphes et agrégées (voir image TEM, fig. 4.9 A). Il n'est donc pas pertinent de modéliser les variations du rapport de dépolarisation en considérant une augmentation de la longueur des aiguilles. La diminution initiale du rapport de dépolarisation, reproductible, est donc liée à d'autres phénomènes.

En revanche, la seconde partie de la courbe peut être reliée à une augmentation de la taille des aiguilles. En effet, la simulation montre pour certains rapports u une augmentation similaire de D_{pol} suivie par

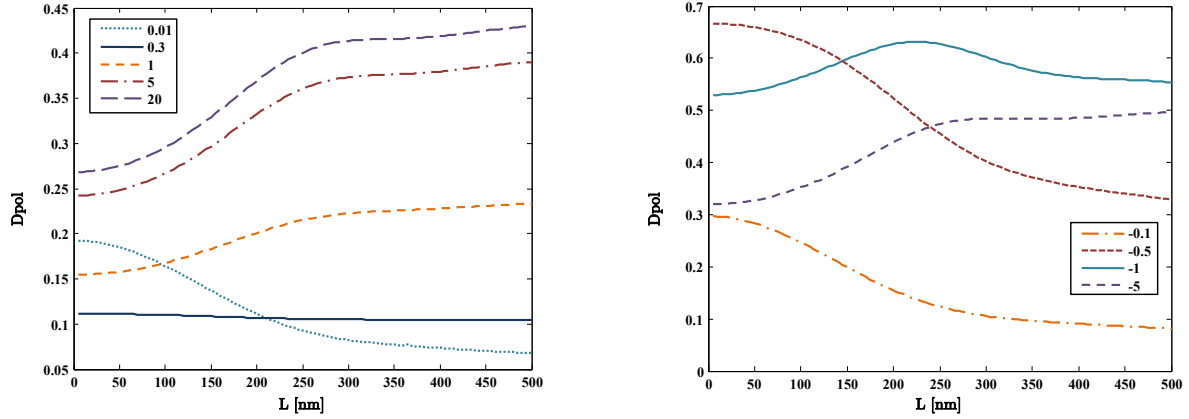


Figure 4.13 – Simulation du rapport de dépolarisation en fonction de la longueur des particules pour différents rapports β_{31}/β_{33} .

un plateau lorsque la longueur L augmente. Si l'on considère que la taille des aiguilles augmente avec le temps, on observe donc une bonne concordance entre les mesures et le modèle.

Cependant, cette modélisation ne peut être utilisée qu'à titre indicatif en raison de l'absence d'informations concernant certains paramètres influents nécessitant une vérification. En particulier, le rapport u est ici un paramètre libre de la simulation car non connu. On peut noter que le minimum expérimental du rapport de dépolarisation, $D_{pol}=0,21$, pourrait correspondre au rapport de nanocristaux sphériques d'après le mécanisme de croissance proposé. Expérimentalement il pourrait être intéressant de le confirmer indépendamment à partir de mesures sur des suspensions de nanoparticules sphériques d'iodate de fer.

D'autre part, on a montré en début de ce chapitre que l'augmentation de la concentration entraînait une augmentation de D_{pol} , or, la concentration des nanoparticules cristallisées augmente effectivement lors de la réaction étudiée. Cependant, les variations de D_{pol} étudiées sont ici particulièrement importantes et difficiles à expliquer par le simple fait de la concentration.

Il est également intéressant de noter que les effets d'accord de phase ne sont pas pris en considération dans ce modèle. Pour des aiguilles faisant entre 200 et 500 nm de long, cela semble raisonnable. Cependant, les observations en microscopie électronique montrent que les aiguilles peuvent croître jusqu'à une longueur de 1 à 2 μm et à ces échelles, il est sans doute nécessaire de prendre en compte l'accord de phase.

Par ailleurs, comme nous en avons déjà discuté, il serait également intéressant de modéliser le fait que le champ interne soit modifié directement du fait de la forme anisotrope des cristaux [Ruda 07].

Pour conclure, nous avons observé une variation du rapport de dépolarisation lors de la croissance de nanoaiguilles d'iodate de fer qui peut être expliquée par l'influence de la forme et de la taille de ces particules. Nous avons comparé ces variations avec une simulation basée sur le calcul de l'intensité diffusée par des structures unidimensionnelles. Ce modèle considère, pour une aiguille donnée, la somme cohérente des ondes diffusées par chaque élément de cette aiguille. L'intensité détectée est alors la somme incohérente des ondes diffusées par chaque aiguille. La simulation permet de retrouver des variations du rapport de dépolarisation similaires aux observations expérimentales. Plus généralement, cette étude montre bien l'intérêt de mesures résolues en polarisation pour sonder une organisation à l'échelle de la particule.

III Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des coefficients optiques non linéaires indépendants des nanocristaux. Nous avons pu estimer le rapport de dépolarisation des différents matériaux étudiés dans le cadre de ce projet de recherche. Parmi ceux-ci, le ZnO et le BaTiO₃ sont deux

matériaux dont le tenseur d'hyperpolarisabilité ne comporte, dans les conditions de Kleinman, que deux éléments indépendants. Il a alors été possible de déterminer les valeurs du rapport de ces coefficients β_{31}/β_{33} . Dans le cas du BaTiO_3 , les mesures sont plutôt délicates pour cause de mauvaise stabilité des suspensions et les résultats n'ont pas montré de concordance avec les valeurs de la littérature. Dans le cas du ZnO , en revanche, la comparaison avec les valeurs de la littérature a permis de sélectionner une de ces valeurs de β_{31}/β_{33} , égale à -0,17.

Du point de vue expérimental, nous avons observé que la stabilité du système de détection est relativement adaptée à ces mesures résolues en polarisation et permet une bonne reproductibilité des mesures. Par contre, d'autres facteurs semblent influencer sur ces mesures, en particulier la concentration des suspensions et la polydispersité, dont l'effet n'est pas bien compris actuellement.

De plus, nous nous sommes également penchés sur l'effet de la forme des particules sur le rapport de dépolarisation. Expérimentalement, l'étude *in-situ* de la croissance d'aiguilles d'iodate de fer a montré une variation de ce rapport. L'effet de la propagation du champ électrique et la sommation cohérente du signal de GSH le long de ces cristaux a permis d'expliquer en partie ces observations.

I Introduction

I.1 Particularités et intérêts du BiFeO_3

Les multiferroïques sont des composés présentant simultanément plusieurs ordres tels que la ferroélectricité, le ferromagnétisme ou la ferroélasticité. Parmi ceux-ci, la ferrite de bismuth (ou BFO) est ferroélectrique et antiferromagnétique. La coexistence de ces propriétés à température ambiante font de ce matériau magnéto-électrique l'un des plus étudiés. De structure non-centrosymétrique, il est piézoélectrique et présente également des propriétés optiques non linéaires de second ordre.

Les applications des multiferroïques sont variées puisqu'ils permettent le couplage de plusieurs propriétés. Par exemple, pour un matériau ferromagnétique, l'application d'un champ électrique peut modifier son aimantation, ce qui permet d'envisager de nouveaux moyens de stockage de données [Catalan 09]. La majorité des applications du BFO sont actuellement envisagées sous forme de couches minces [Wang 03] et incluent mémoires, capteurs, actionneurs, mémoires vives (RAM) non volatiles ou encore systèmes micro-électromécaniques. L'utilisation de nanocristaux de BFO pourrait également être envisagée en raison de l'amplification des propriétés magnétiques à cette échelle [Park 10].

Dans le cadre des projets Naomi et Namdiatream, le premier intérêt de ce matériau concerne ses propriétés de GSH. En effet, même si celles-ci ont été très peu étudiées, il semblerait que l'efficacité optique non linéaire du BFO soit particulièrement élevée [Kumar 08], ce qui est un avantage évident pour le marquage optique. Par ailleurs, la possibilité de l'utiliser conjointement en tant que marqueur optique et pour ses autres spécificités, fait de ce matériau un candidat remarquable pour les applications biologiques. En particulier, ses propriétés magnétiques pourraient être exploitées dans le cadre d'autres techniques d'imagerie telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou plus simplement pour séparer sélectivement au moyen d'un aimant certains composants biologiques marqués. De nouvelles possibilités en termes d'imagerie multimodale ou d'applications théranostiques (diagnostic et thérapie) pourraient donc émerger de l'utilisation de ce matériau.

I.2 Propriétés physiques générales

A température ambiante, la structure cristalline du BFO est définie dans un système rhomboédrique constitué de deux mailles perovskites pseudo-cubiques et de groupe ponctuel $3m$ [Moreau 71]. Le système hexagonal est parfois aussi utilisé comme référence pour décrire la structure du BFO, comme le montre la figure 5.1.

La ferroélectricité du BFO est due à la distorsion pseudo-cubique de la structure pérovskite entraînant un déplacement des ions Bi^{3+} et Fe^{3+} et une déformation des octaèdres d'oxygène. Ce déplacement est à l'origine de la séparation des barycentres des charges positives et négatives, impliquant une polarisation spontanée. La littérature recense des valeurs de polarisation allant jusqu'à $100 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ dans des

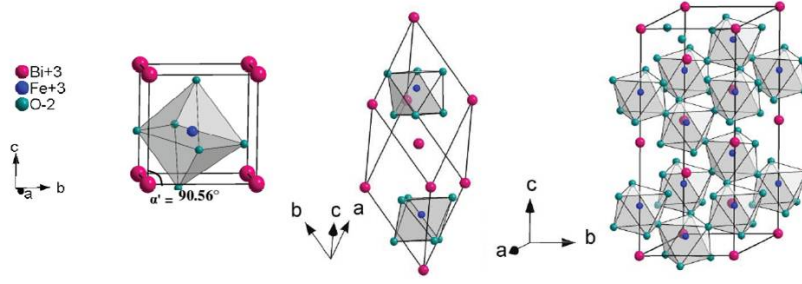


Figure 5.1 – Représentation de la structure cristalline de BiFeO_3 dans (de gauche à droite) la maille pseudo-cubique ($a = 3,96$ et $\alpha = 89,47^\circ$), la maille rhomboédrique ($a_{rh} = 5,63$ et $\alpha_{rh} = 59,35^\circ$), et la maille hexagonale ($a_{hex} = 5,58$ et $c_{hex} = 13,87$). *Extrait de [Lebeugle 07a].*

monocristaux de BFO [Lebeugle 07b], ce qui constitue l'une des plus élevées pour des matériaux de ce type. Au-delà de la température de Curie $T_C = 825^\circ\text{C}$, une transition structurale fait apparaître une phase β centrosymétrique [Catalan 09]. Le matériau devient alors paraélectrique et perd évidemment ses propriétés de GSH.

A température ambiante, le BFO possède également un ordre antiferromagnétique, de type G, en raison des moments magnétiques des ions Fe^{3+} qui sont orientés antiparallèlement avec chacun de leurs voisins immédiats. Cet ordre prend fin à la température de Néel $T_N = 370^\circ\text{C}$ au-delà de laquelle la distribution des moments de spins devient aléatoire à cause de l'agitation thermique, rendant le matériau paramagnétique [Catalan 09].

Les propriétés optiques de ce matériau font état d'absorption dans le domaine du visible. Celle-ci est liée à une énergie de bande interdite, de 2,8 eV à température ambiante [Catalan 09] correspondant à une absorption théorique des longueurs d'ondes inférieures à 443 nm. Cette caractéristique confère au BFO une couleur allant du jaune au brun selon la pureté des cristaux [Fujino 07]. Une étude portant sur des nanoparticules de BFO de 100 nm fait état d'une limite d'absorption à 565 nm [Gao 07], comme le montre le spectre de la figure 5.2. De plus, le BFO est un matériau biréfringent pour lequel l'indice de réfraction moyen est estimé à $n_{BFO} = 2,62$, selon [Rivera 97].

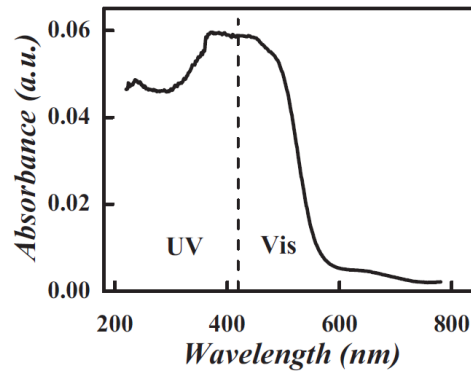


Figure 5.2 – Spectre d'absorbance UV-visible de nanoparticules de BFO. *Extrait de [Gao 07].*

I.3 Propriétés optiques non linéaires

Contrairement aux propriétés ferroélectriques et magnétiques du BFO, ses propriétés optiques non linéaires ont été très peu étudiées jusqu'à présent.

Les premiers travaux faisant appel aux propriétés de GSH du BFO portent sur des couches minces. Les recherches mentionnent l'exploitation de la GSH pour une meilleure compréhension de l'interaction entre magnétisme et ferroélectricité au sein de ce matériau [Kartavtseva 07] ou encore comme moyen de vérification du groupe ponctuel de ces films [Ihlefeld 07]. La littérature recense d'autres exemples de l'utilisation de ces propriétés optiques pour la caractérisation structurale et magnétique de couches minces de BFO, ayant subi un recuit magnétique [Kim 09], ou des contraintes mécaniques [Kim 13].

On rappelle ici le tenseur optique non linéaire de second ordre du BFO :

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & -d_{22} \\ -d_{22} & d_{22} & 0 & d_{15} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

La caractérisation des propriétés ONL de ce matériau est présentée pour la première fois dans une étude portant sur des couches minces monocristallines [Kumar 08]. La détermination des coefficients indépendants de ce matériau a ainsi permis d'obtenir les résultats suivants, pour une longueur d'onde incidente de 800 nm : $d_{15}/d_{22} = 0,20$; $d_{31}/d_{22} = 0,35$; $d_{33}/d_{22} = -11,4$ et $d_{22} = 298,4$ pm/V. Les calculs théoriques effectués à partir de ces valeurs semblent indiquer une efficacité de GSH très élevée, avec un coefficient moyen $\langle d \rangle = 1418$ pm/V !

Un peu plus récemment, un autre travail a porté sur des monocristaux de taille centimétrique obtenus par méthode de flux [Yokota 09b]. Afin de travailler sur des échantillons quasi-transparents, des tranches de 1 mm² de surface et de 10 µm d'épaisseur ont été découpées puis étudiées sous microscopie de GSH. L'utilisation de tels échantillons permet de limiter les erreurs dues aux contraintes qui sont généralement présentes dans les couches minces et ont tendance à modifier les propriétés du matériau. De plus, le phénomène d'accord de phase est généralement plus délicat à prendre en compte dans les couches minces en raison de leur faible épaisseur. Cependant, seules des mesures relatives sont obtenues dans ce travail, à la longueur d'onde de 1064 nm : $d_{22}/d_{31} = -0,028$; $d_{15}/d_{31} = 15$; $d_{33}/d_{31} = -2,3$ et $d_{32} = d_{31}$. La détermination de l'efficacité moyenne de GSH de ce matériau n'a donc pas été réalisée jusqu'à présent. Des recherches ultérieures menées par le même groupe utilisent ces propriétés de GSH afin d'étudier les domaines ferroélectriques de ces monocristaux et leur évolution autour de la température de Néel [Yokota 09a, Matsuura 10].

Conclusion

Bien que quelques travaux de recherche utilisent les propriétés de GSH du BFO comme outil d'aide à la caractérisation structurale de ce matériau, seules deux publications s'intéressent véritablement à la détermination de ses coefficients ONL. Cela peut s'expliquer par la difficulté à obtenir des cristaux de bonne qualité. Par ailleurs, la caractérisation ONL des couches minces n'est pas toujours représentative des propriétés du matériau massif. Cependant, les premières estimations de l'efficacité de GSH du BFO semblent très prometteuses et constituent une motivation incontestable pour la détermination des coefficients moyens de nanoparticules par la technique HRS. C'est ce que nous présentons dans la partie suivante.

II Caractérisations optiques non linéaires

Introduction

Dans cette partie, l'objectif du travail est donc de déterminer l'efficacité de GSH de particules de BFO, de manière à pouvoir la comparer aux autres matériaux précédemment étudiés. Ce matériau étant encore peu connu sous forme de nanoparticules, la caractérisation HRS a été réalisée en parallèle avec le développement des techniques de synthèse. Dans une première partie, nous présentons donc les résultats

préliminaires obtenus à partir de particules de BFO synthétisées par des voies chimiques différentes. Dans une seconde partie, la détermination plus rigoureuse du coefficient moyen $\langle d \rangle$ d'un échantillon de BFO sélectionné est présentée.

II.1 Mesures HRS sur différents échantillons

II.1.a Premières mesures

Fournies par la société FEE, deux séries d'échantillons obtenues par diverses méthodes ont été caractérisées par HRS. La figure 5.3 présente les suspensions de la première série obtenues après préparation, avant et après décantation. Parmi ces échantillons, les cinq premiers ont été obtenus par la méthode Pechini, les deux suivants par synthèse polyol et les trois derniers par précipitation. Différents paramètres tels que les réactifs utilisés ou les températures de recuit varient d'un échantillon à l'autre.

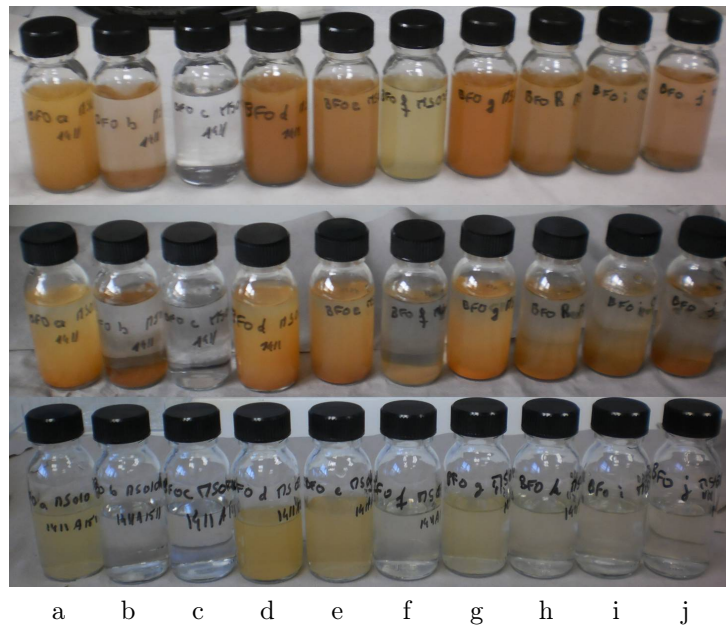


Figure 5.3 – Solutions aqueuses de nanocristaux de BFO à pH neutre de concentration initiale de 0,5 mg/mL, après sonification (en haut), après sédimentation (milieu) et surnageants correspondants (en bas).

Comme on peut le constater visuellement sur la figure 5.3, la stabilité n'est pas similaire d'une suspension à l'autre. D'une méthode de synthèse à l'autre, les propriétés de surface des particules peuvent varier, ce qui modifie leur stabilité. De plus, la taille dépend également du type de synthèse et du recuit utilisé, et peut influencer directement sur la stabilité, les grosses particules ayant tendance à sédimenter plus facilement. Par exemple, les trois premiers échantillons diffèrent uniquement par la température de recuit appliquée, qui est de 400°C pour le *a* alors qu'elle est de 600°C et 800°C pour les cas *b* et *c* respectivement. Il apparaît ici que la taille des cristaux augmente fortement avec l'augmentation de la température de recuit, ce que l'on observe facilement avec d'autres méthodes de caractérisation en taille, telles que l'observation MEB ou la diffusion laser sur des poudres non désagrégées. La préparation de suspensions avec nos méthodes usuelles confirme la très faible quantité de petites particules obtenues avec une température de recuit élevée pour ce procédé. Dans le cas des échantillons *b*, *c*, *f* et *j*, la polydispersité et/ou l'instabilité des particules n'ont pas permis d'obtenir une caractérisation en taille fiable par DLS. Par ailleurs, les mesures de concentration ont fourni des résultats peu précis avec une incertitude relative allant jusqu'à 0,8 pour ces mêmes échantillons ainsi que pour la suspension *h*, en raison notamment de leur très faible valeur.

Malgré ces difficultés, une caractérisation HRS qualitative a été réalisée sur l'ensemble de la série.

Les résultats présentés dans la figure 5.4 ne peuvent être comparés quantitativement car le signal HRS dépend des tailles et concentrations, qui varient fortement d'une suspension à l'autre.

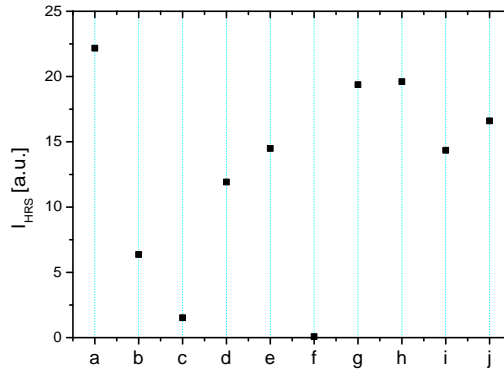


Figure 5.4 – Caractérisation HRS qualitative de différents échantillons de BFO (série 1).

Cette mesure optique permet cependant de constater que l'échantillon f est le seul pour lequel aucun signal de GSH n'a été détecté. C'est également le seul à n'avoir subi aucun recuit. Les résultats de DRX confirment la présence d'une phase amorphe. Parmi les autres échantillons, le b et le c présentent un signal HRS relativement faible par rapport aux autres échantillons, ce qui peut s'expliquer par leur faible concentration. Cependant ce signal est non négligeable par rapport au pNA, ce qui confirme la présence de BFO cristallisé, également détecté sur les profils de diffraction de DRX. Les autres suspensions diffusent un signal de GSH relativement élevé. En particulier, on note que la très faible concentration des échantillons h , i et j n'empêche pas l'émission d'un signal intense, ce qui semble indiquer une efficacité optique importante. Ces particules sont aussi celles pour lesquelles la qualité cristalline est la meilleure en ce qui concerne la pureté.

Globalement, ces résultats nous donnent donc une première idée de l'efficacité optique des particules de BFO. On a vu d'après la littérature que les coefficients ONL de second ordre sont particulièrement élevés par rapport aux autres matériaux étudiés dans ce projet. Une grossière approximation des coefficients $\langle d \rangle$ obtenue à partir de ces suspensions semble annoncer une efficacité de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de pm/V, mais ces valeurs doivent être considérées avec beaucoup de précautions. Elles confirment néanmoins la forte efficacité de GSH du BFO.

II.1.b Deuxième série de mesures : estimations plus précises

Une seconde série de particules a été réalisée par la méthode combustion. Les différences entre échantillons se trouvent au niveau de la composition initiale en éléments bismuth et fer. Les fractions de bismuth prises en compte vont de 0,9 à 1,1 avec un pas de 0,05.

Ces échantillons sont caractérisés quantitativement et les résultats sont présentés sur la figure 5.5. La taille DLS moyenne varie entre 90 et 130 nm pour l'ensemble des suspensions étudiées. Par ailleurs, des effets d'absorption et/ou diffusion ont été observés avec l'augmentation de la concentration et pris en compte.

Sur la figure 5.5 (a), les valeurs de $\langle d \rangle$ sont présentées en fonction de la fraction initiale de Bismuth, x_{Bi} . On observe des variations significatives d'un échantillon à l'autre. Pour $x_{Bi} < 1$, le coefficient $\langle d \rangle$ est faible mais il augmente jusqu'à 33 pm/V pour $x_{Bi} = 1$.

Afin d'expliquer les variations d'efficacité de GSH en fonction de la composition, nous nous sommes intéressés à la qualité cristalline des nanocristaux caractérisée par DRX. Comme on peut le voir sur la figure 5.5 (b), les deux échantillons dont la fraction de bismuth est inférieure à 1 semblent assez purs et bien cristallisés tandis que la présence d'impuretés est visible sur les échantillons de composition $x_{Bi} \geq 1$. On note ici que les phases cristallines parasites correspondent à un mélange de Bi_2O_3 et de $\text{Bi}_{24}\text{Fe}_2\text{O}_{39}$.

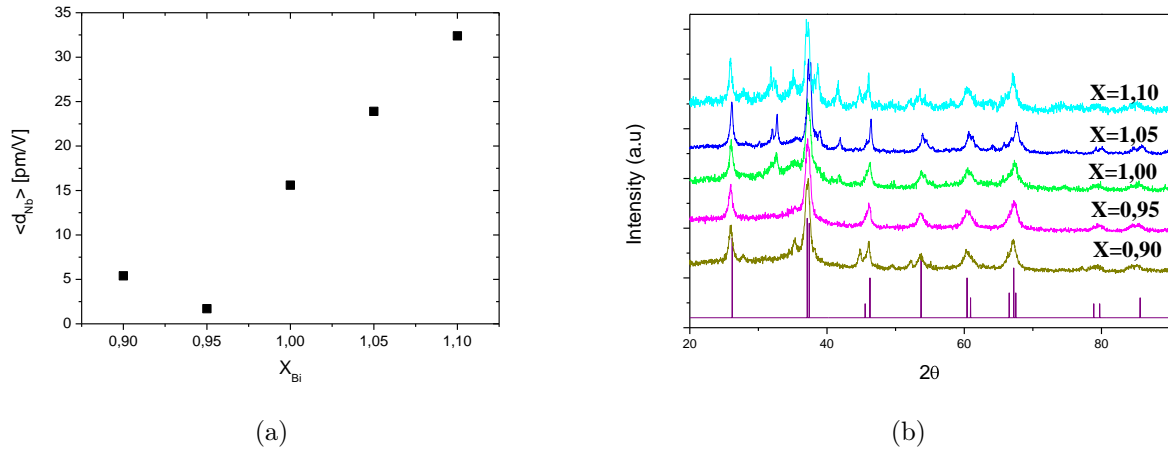


Figure 5.5 – (a) Coefficients moyens $\langle d \rangle$ en fonction de la fraction de bismuth dans le BFO (série 2) et (b) diagrammes de DRX pour les mêmes échantillons ainsi que les pics de référence pour le BiFeO₃.

Cette dernière est non-centrosymétrique mais son efficacité de GSH est inconnue. Les variations de $\langle d \rangle$ observées ne peuvent donc s'expliquer à travers cette analyse de la qualité cristalline puisque les particules les plus pures présentent l'efficacité la plus faible.

Un deuxième paramètre pouvant influencer sur le signal de GSH diffusé est la taille des nanocristaux. Comme on peut le voir sur les diagrammes de DRX, la largeur des pics indique la présence de très petits nanocristaux. Contrairement aux résultats de la DLS qui présentent des tailles de l'ordre de 100 nm, l'évaluation des dimensions des nanocristaux par la formule de Scherrer à partir de ces données de DRX donne une taille de 18 à 20 nm pour les trois premiers échantillons $x_{Bi} \leq 1$ et d'environ 30 nm pour les deux autres. Ce décalage entre les tailles données par DLS et DRX est caractéristique de la présence d'agglomérats dans la suspension. La détermination des coefficients moyens $\langle d \rangle$ a donc été recalculée à partir de ces tailles monocristallines. Ces coefficients moyens sont évidemment bien plus élevés, variant entre 20 et 420 pm/V. Mais l'on observe toujours des variations et cette correction en taille n'explique pas les différences entre échantillons.

On constate pour conclure que cette première analyse matériau ne suffit pas pour comprendre les variations de coefficient moyen, variations significatives et largement supérieures à l'incertitude expérimentale. On pourrait cependant poursuivre l'analyse en s'interrogeant sur l'effet des contraintes résiduelles ou de la composition finale des particules. Sur ce dernier point, par exemple, des études sur LiNbO₃ ont montré une variation des d_{ij} fonction de la composition [Klein 03].

II.1.c Conclusion et particularités des caractérisations HRS du BFO

Couplée à d'autres techniques essentielles telles que la DRX et la microscopie électronique, la caractérisation HRS est un bon indicateur des performances optiques des nanoparticules, qui peut être utilisé pour l'amélioration des techniques de synthèse. De manière simple, cette technique permet au premier abord d'obtenir des indications qualitatives concernant l'émission ou non de GSH des nanoparticules. Des mesures plus précises tendent à confirmer les efficacités de GSH élevées indiquées dans la littérature.

Par ailleurs, ces résultats préliminaires nous ont permis d'appréhender diverses problématiques concernant le BFO. On a remarqué par exemple que certaines techniques de synthèse génèrent de grosses particules, difficiles à stabiliser en suspension, ce qui pose problème pour la caractérisation HRS. Concernant la taille, on a également noté d'après les résultats de la DRX que certains échantillons étaient constitués de particules agrégées ou polycristallines. Pour finir, l'absorption optique de ce matériau dans le visible peut également influencer sur le signal HRS. Par la suite, ces différents constats seront donc pris en compte pour réaliser une mesure la plus fiable possible.

II.2 Coefficients moyens du BFO

L'objectif principal de ce paragraphe est de déterminer avec une meilleure précision les coefficients moyens des particules de BFO, et en particulier le coefficient $\langle d \rangle$ afin de pouvoir le comparer aux autres marqueurs optiques potentiels. A partir des mesures préliminaires présentées précédemment, nous avons défini les premiers paramètres à prendre en compte pour le choix d'un échantillon, notamment la stabilité des nanocristaux en suspension et l'efficacité de GSH relativement élevée. Nous avons ainsi décidé de caractériser des nanocristaux synthétisés par la méthode de combustion et de fraction de bismuth élevée, soit $x_{Bi} = 1$.

Afin de réaliser une caractérisation fiable, il est nécessaire de s'assurer des différentes caractéristiques de l'échantillon étudié telles que la structure cristalline, la taille des cristaux et la présence ou non d'impuretés. Nous avons donc sélectionné un échantillon, fourni comme les précédents par la société FEE, pour lequel ces caractéristiques sont validées. Comme le montre le spectre DRX de cet échantillon de BFO (figure 5.6 (a)), les cristaux sont relativement purs.

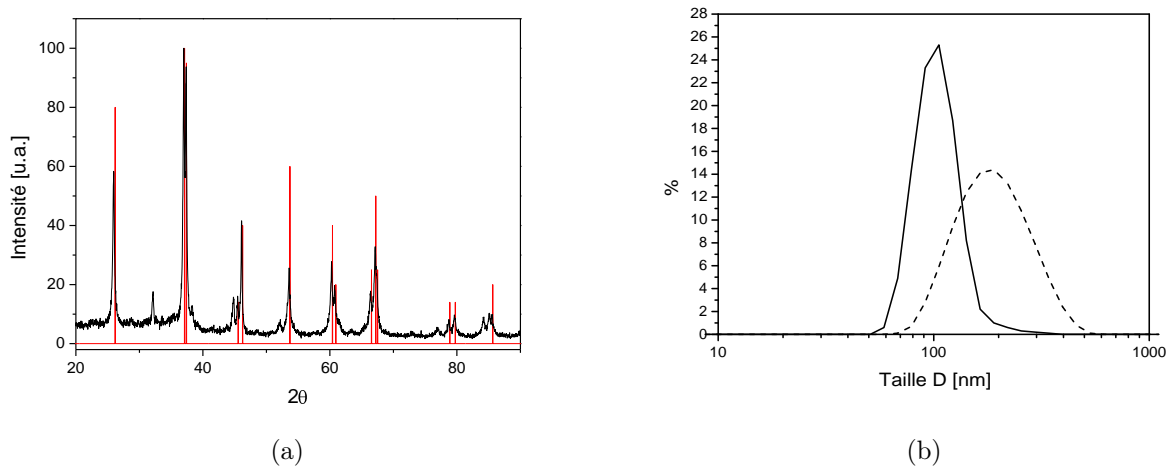


Figure 5.6 – (a) Diagramme de diffraction de rayons X sur des poudres de BFO et pics de référence pour ce matériau. (b) Taille des particules de BFO déterminées par DLS, en intensité (pointillés) et en nombre (trait plein).

La suspension préparée dans l'éthanol est stable. Après sédimentation, la taille des particules du surnageant, obtenue par DLS, est évaluée à 106 nm (taille moyenne en nombre), comme le montre la figure 5.6 (b).

La présence de nombreux agrégats ayant été observée précédemment sur certains échantillons de BFO, nous avons donc cherché à déterminer la taille des cristallites par la formule de Scherrer. La taille ainsi obtenue est de 56 nm. On sait que cette méthode est peu précise mais indique cependant l'absence de petits cristaux de l'ordre de 20 nm, ce qui confirme dans une certaine mesure le résultat obtenu par DLS.

La microscopie électronique à balayage a également permis de contrôler la forme des particules (fig. 5.7). La forme est peu sphérique mais relativement isotrope. Par ailleurs, on observe la présence de certains agrégats. Ceux-ci peuvent être cependant attribués à des effets de séchage lors de la préparation des échantillons pour la microscopie et ne correspondent donc pas nécessairement aux particules des suspensions colloïdales. Les tailles MEB sont d'environ 100 nm, et en bon accord avec les résultats de la DLS.

Par la suite, des dilutions sont réalisées afin de procéder à la mesure HRS. Comme on peut le voir sur la figure 5.8, les suspensions translucides et colorées deviennent transparentes et incolores lorsque la concentration en particules diminue. On a vu au chapitre 3 l'effet de la turbidité sur le signal HRS pour d'autres suspensions. La diffusion de la lumière par les particules entraîne une atténuation du signal qui suit une loi exponentielle avec la concentration. Nous retrouvons ici le même phénomène, avec en plus la contribution de l'absorption des particules de BFO (fig. 5.9 (a)).

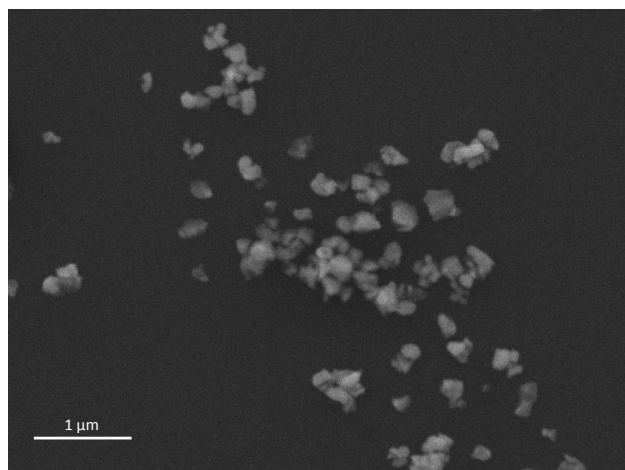
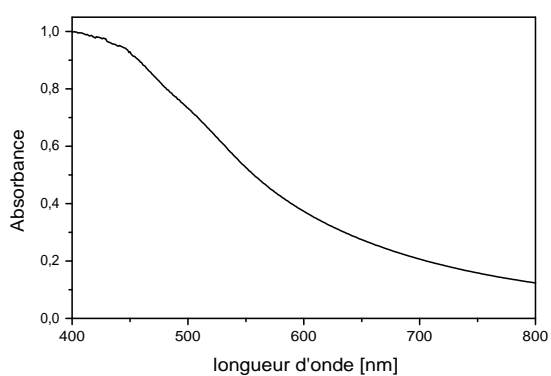


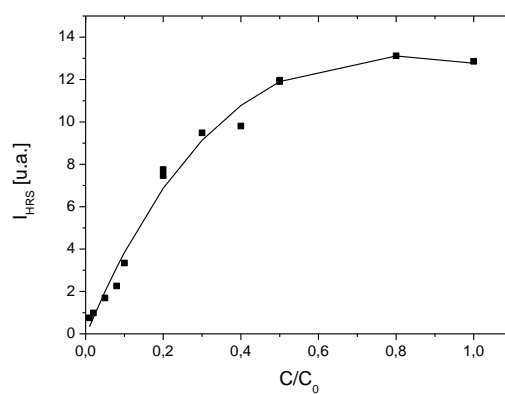
Figure 5.7 – Observation MEB des nanoparticules de BFO.



Figure 5.8 – Échantillons de BFO de différentes concentrations obtenues après dilution. Les concentrations relatives pour chaque échantillon sont (de gauche à droite) : 1 ; 0,8 ; 0,2 ; 0,02.



(a)



(b)

Figure 5.9 – (a) Absorbance UV-visible d'une suspension de BFO. (b) Comportement exponentiel de l'intensité HRS en fonction de la concentration.

Précédemment, les mesures étaient effectuées avec des concentrations pour lesquelles les effets de turbidité n'apparaissaient plus et le signal HRS était linéaire en fonction de la concentration. L'absorption rend ici ce procédé moins évident à mettre en œuvre. Les deux contributions d'atténuation du signal suivant une loi exponentielle, on utilise alors un fit prenant en compte ce comportement, comme indiqué sur la figure 5.9 (b).

Par ailleurs, les imprécisions éventuelles sur le signal liées à l'instabilité des suspensions, ou la présence de luminescence ont été écartés. L'incertitude sur la mesure de concentration par pesée est également évaluée et validée avec une incertitude relative de 0,01.

Les résultats de cette analyse permettent d'obtenir les coefficients moyens (pour une taille en nombre de 106 nm) $\langle \beta_{BFO} \rangle = 55,9 \cdot 10^{-24}$ esu et $\langle d_{BFO} \rangle = 38$ pm/V. L'efficacité de GSH des particules de BFO est donc, d'après cette caractérisation, environ cinq fois plus élevée que les efficacités des autres nanoparticules étudiées précédemment, comme on peut le voir sur la figure 5.10 (a). Par ailleurs, le rapport de dépolarisation de ce matériau, évalué à partir de la mesure présentée figure 5.10 (b), est de $D_{pol} = 0,91$, ce qui est nettement plus élevé que les valeurs de 0,23 [Kumar 08] et 0,42 [Yokota 09b] obtenues à partir de la littérature.

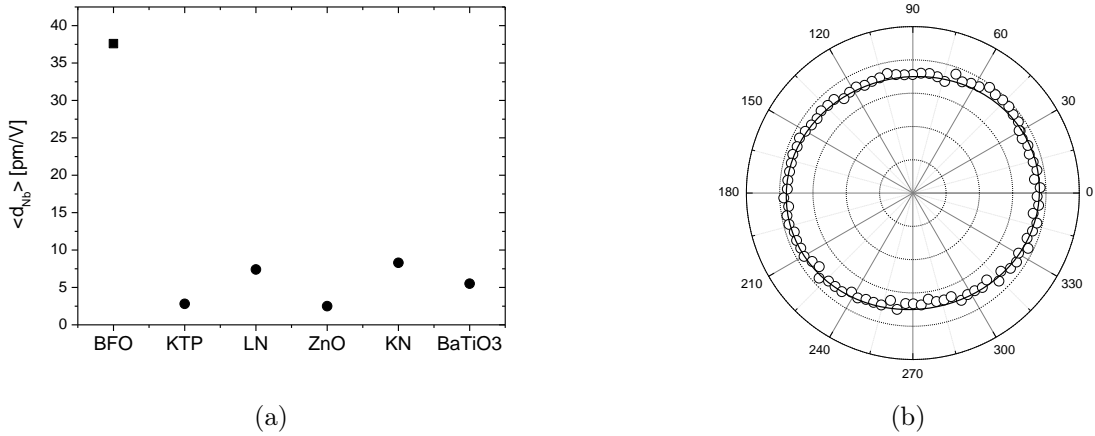


Figure 5.10 – (a) Coefficients moyens $\langle d \rangle$ pour une taille en nombre du BFO et comparaison avec les autres matériaux étudiés précédemment. (b) Mesure résolue en polarisation pour un échantillon de BFO/

III Conclusion

Le BFO est un matériau connu pour ses différentes propriétés ferroélectriques et magnétiques mais dont les propriétés optiques non linéaires sont peu exploitées à l'heure actuelle, en raison de difficultés d'élaboration des cristaux et des propriétés d'absorption atténuant l'émission de lumière dans le visible.

A l'échelle nanométrique, des particules de BFO ont été caractérisées à l'aide de la technique HRS et les efficacités GSH ont pu être déterminées avec une bonne fiabilité. Les coefficients moyens ainsi obtenus indiquent une efficacité particulièrement élevée par rapport aux autres nanoparticules étudiées dans le cadre de ce projet, ce qui semble très prometteur pour les applications biomédicales. Les coefficients optiques élevés permettent en effet d'améliorer le contraste en microscopie de GSH, ce qui favorise l'utilisation de marqueurs plus petits et offre de nouvelles perspectives en termes d'interaction avec l'échelle biologique. De meilleures performances optiques sont par ailleurs espérées pour ce matériau, notamment grâce à l'amélioration des techniques de synthèse. Dans ce contexte, l'obtention de particules de petite taille et de bonne qualité cristalline reste un enjeu majeur.

Conclusion

Les nanocristaux optiquement non linéaires bénéficient de propriétés intrinsèques particulièrement avantageuses pour des applications en imagerie biomédicale. Leur utilisation en microscopie multiphotonique offre par exemple la possibilité de réaliser un marquage biologique à fort contraste et sur de longues durées. La flexibilité en longueur d'onde de ces marqueurs favorise par ailleurs leur utilisation dans des gammes spectrales où les tissus biologiques absorbent peu, ce qui ouvre de nouvelles perspectives en termes de profondeur d'imagerie. Enfin, les propriétés de cohérence de l'émission de second harmonique peuvent être aussi exploitées afin de déjouer, en imagerie optique, les difficultés propres aux milieux diffusants. Dans l'ensemble, les différents travaux de la littérature sur l'imagerie biphotonique et le marquage spécifique à partir de ces nouveaux agents de contraste sont très encourageants, d'autant plus que les premières études de toxicité ne semblent pas rédhibitoires.

Dans ce contexte, l'utilisation de ces nanocristaux non-centrosymétriques en tant qu'agents de contraste nécessite une quantification précise de leurs propriétés physiques, en particulier optiques non linéaires et ce afin de pouvoir sélectionner les meilleurs nanomatériaux. Parmi les cristaux étudiés dans le cadre de ce travail, la plupart sont déjà connus en tant que cristaux massifs et utilisés pour leurs propriétés optiques pour des applications laser. En raison d'une utilisation encore peu fréquente à l'échelle nanométrique et afin d'améliorer la compréhension des réponses ONL à cette taille, il apparaissait important d'étudier d'éventuels effets de taille et de déterminer les différentes configurations expérimentales permettant de quantifier au mieux l'efficacité de GSH de ces nanocristaux.

Dans ce but, la technique de diffusion Hyper-Rayleigh a été adaptée à la caractérisation de nanoparticules de taille typique 100 nm. Les différents paramètres impliqués dans la mesure ont été étudiés et pris en compte afin de quantifier les propriétés optiques de manière fiable. En particulier, l'influence sur le signal HRS d'effets connexes tels que l'aggrégation des nanocristaux, la diffusion ou l'absorption des suspensions ainsi que la présence de signaux parasites a été évaluée. A partir de cette analyse, nous avons pu déterminer l'hyperpolarisabilité $\langle\beta\rangle$ et le coefficient optique non linéaire moyen $\langle d \rangle$ des différents nanocristaux mentionnés dans l'état de l'art et dans le cadre du projet.

Pour des nanocristaux de BaTiO₃, KNbO₃, KTP, LiNbO₃ et ZnO, les résultats obtenus indiquent des coefficients optiques moyens variant de 2 à 8 pm/V, c'est-à-dire relativement proches d'un matériau à l'autre. Les hyperpolarisabilités correspondantes $\langle\beta\rangle$ des particules sont comprises entre 0,3 et 34.10^{-24} esu. Celles-ci dépendent principalement de la taille des nanocristaux puisque les valeurs de $\langle d \rangle$ sont assez similaires. Par ailleurs, la comparaison avec les valeurs de la littérature obtenues à partir de cristaux massifs a permis de confirmer l'hypothèse que le signal de GSH résulte du volume des nanocristaux et non d'effets de surface. Une conclusion importante de ce travail concerne enfin le choix des nanocristaux pour une utilisation en imagerie biomédicale. En raison de la similitude des coefficients ONL obtenus, la sélection d'un matériau ne repose pas que sur des considérations optiques mais plutôt sur d'autres

paramètres tels que la stabilité chimique, la compatibilité avec les milieux biologiques et la toxicité. Dans le cadre des projets NAOMI et NAMDIATREAM et à la suite de ce travail, les études se focalisent aujourd'hui sur les particules de KNbO_3 qui présentent une bonne efficacité ONL et surtout une bonne stabilité chimique ainsi qu'une faible toxicité.

Des mesures résolues en polarisation ont également été effectuées afin de déterminer les coefficients indépendants d_{ij} de ces nanocristaux. La technique HRS présente ici un avantage car elle ne nécessite pas de connaître a priori l'orientation des cristaux. Cependant, seule l'analyse sur les matériaux de tenseurs « simples » (c'est-à-dire ne comportant que deux éléments indépendants) peut être menée à terme. D'une manière générale, nous avons observé certaines déviations entre la réponse en polarisation des particules et les simulations réalisées à partir des coefficients des cristaux massifs. Ceci montre bien la nécessité d'une caractérisation à l'échelle nanométrique pour des particules dont les tailles, formes et états d'agglomérations doivent être contrôlés au mieux. En effet, nous avons aussi mesuré dans une dernière partie des variations importantes du rapport de dépolarisation lors de la croissance d'aiguilles d'iodate de fer que nous avons attribuées (à l'aide de simulations) à un effet de longueur de ces structures unidimensionnelles. Enfin, des caractérisations optiques ont été réalisées sur des nanocristaux de BFO dont les propriétés de GSH ont été très peu étudiées jusqu'à présent. Les résultats indiquent un coefficient $\langle d \rangle$ de 38 pm/V c'est-à-dire bien plus élevé que les autres nanomatériaux mentionnés précédemment. Leur utilisation en tant qu'agent de contraste optique est donc pertinente, d'autant plus qu'ils semblent présenter une faible toxicité d'après les études menées en parallèle. Ces nanocristaux présentent par ailleurs un double intérêt pour des applications biomédicales en raison de leurs propriétés magnétiques qui permettent d'envisager leur utilisation comme nano-sondes multifonctionnelles.

Perspectives

◇ Caractérisation HRS de nanocristaux

Plusieurs pistes peuvent être proposées dans le but d'améliorer la caractérisation optique non linéaire de nanocristaux par HRS. Au vu des différents problèmes expérimentaux soulevés, il serait intéressant de disposer de suspensions "modèles", monodisperses avec une taille et forme contrôlées, qui permettraient dans l'idéal de déterminer les efficacités optiques avec une bien meilleure précision. Cela permettrait également d'approfondir et de conclure quant à la fiabilité de la méthode.

Pour cela, on peut compter sur les travaux portant sur l'amélioration des techniques de synthèse. D'autres pistes intermédiaires pourraient également être explorées. Les méthodes telles que la "Field Flow Fractionation" [Rameshwar 06, von der Kammer 11] pouvant séparer différents nano-objets au sein d'un fluide en fonction de leur taille sont une solution éventuelle pour l'obtention de suspensions monodisperses. Cependant, les concentrations en particules doivent rester suffisamment élevées afin de détecter des niveaux de signal exploitables.

Dans le même ordre d'idée, il serait aussi pertinent d'étudier la réponse en polarisation de suspensions modèles afin de mieux cerner les différents paramètres d'influence tels que la composition chimique du matériau, l'effet de contraintes résiduelles ou l'effet de l'anisotropie des particules.

◇ Amplification des efficacités de GSH par effet plasmonique

L'enrobage de nanocristaux non-centrosymétriques par une couche métallique permet de créer des nano-objets aux propriétés optiques particulières. En effet, pour une longueur d'onde donnée, un effet de résonance plasmonique lié à la couche métallique va amplifier le champ électrique incident et de cette manière, la réponse optique non linéaire qui dépend de l'amplitude de ce champ à la puissance 4. Cette démarche a été proposée récemment par l'équipe du professeur Psaltis [Pu 10]. Peu de travaux expérimentaux ont depuis confirmé ces premiers résultats et il peut être intéressant de poursuivre cette étude. En particulier, étudier la réponse d'une structure cœur-coque sous microscopie ou par HRS en fonction de la longueur d'onde fournirait une preuve expérimentale de l'amplification plasmonique. Cette étude est possible sur la plateforme de microscopie Nikon du GAP-biophotonics de Genève.

Des premiers essais d'encapsulation de particules de KNbO_3 ainsi que des simulations ont été réalisées et implémentées. Les simulations permettent de déterminer théoriquement la longueur d'onde d'amplification plasmonique en fonction de la taille des nanocristaux et de l'épaisseur de la couche d'or. Ces

travaux sont en cours et n'ont pas été abordés dans ce manuscrit. Rappelons tout de même, que d'un point de vue des applications, ces effets sont intéressants car ils améliorent considérablement l'efficacité de GSH des nanocristaux. La flexibilité en longueur d'onde n'est évidemment pas conservée pour ce type de nano-objets. Cependant, la maîtrise des phénomènes d'amplification plasmonique et des méthodes d'élaboration devrait permettre de fabriquer des marqueurs à fort contraste optique et pour lesquels la longueur d'onde d'excitation est prédéfinie, par exemple dans la fenêtre de transparence biologique.

◊ Orientation de nanocristaux de BFO sous champ électrique/magnétique et réponse HRS

Une dernière perspective proposée est basée sur les propriétés ferroélectriques et magnétiques du BFO. L'idée consiste ici à orienter des nanoparticules de BFO en suspension à l'aide d'un champ électrique ou magnétique et à en étudier la réponse de second harmonique. Les enjeux de ce type d'étude consistent par exemple à augmenter le signal de GSH lorsque les marqueurs sont tous orientés dans la même direction sous l'effet du champ extérieur. Dans ce cadre, deux expériences préliminaires ont été réalisées. La première concerne l'application d'un champ électrique sur des suspensions de nanocristaux de BFO directement sur le système expérimental HRS. Une brève augmentation du signal HRS a ainsi été observée mais la difficulté de mise en œuvre de cette expérience n'a pas permis de la quantifier. Ces difficultés sont liées à la nécessité d'appliquer de forts champs électriques sur ces suspensions. Une deuxième expérience a consisté à appliquer, toujours directement sur le système expérimental, un champ magnétique sur les suspensions. Il a clairement été remarqué que la réponse en polarisation des suspensions était modifiée par le champ magnétique. On s'attendait aussi à une réponse cohérente avec une augmentation forte du signal de second harmonique. Cela n'a pas été le cas mais ces travaux sont à poursuivre afin de confirmer les premiers résultats et, de manière plus fondamentale, afin de mieux appréhender l'interaction entre les propriétés optiques non linéaires des nanocristaux et leur dynamique d'orientation sous l'effet de champs magnétique et électrique extérieurs.

Bibliographie

- [Alivisatos 04] Paul Alivisatos. *The use of nanocrystals in biological detection*. Nature biotechnology, vol. 22, no. 1, pages 47–52, January 2004.
- [Aufray 09] Maëlen Aufray, Stéphane Menuel, Yves Fort, Julien Eschbach, Didier Rouxel et Brice Vincent. *New Synthesis of Nanosized Niobium Oxides and Lithium Niobate Particles and Their Characterization by XPS Analysis*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, vol. 9, no. 8, pages 4780–4785, August 2009.
- [Balu 09] Mihaela Balu, Tommaso Baldacchini, John Carter, Tatiana B Krasieva, Ruben Zadoyan et Bruce J Tromberg. *Effect of excitation wavelength on penetration depth in nonlinear optical microscopy of turbid media*. Journal of Biomedical Optics, vol. 14, no. 1, pages 10503–10508, 2009.
- [Baruah 09] Sunandan Baruah et Joydeep Dutta. *Hydrothermal growth of ZnO nanostructures*. Science and Technology of Advanced Materials, vol. 10, no. 1, page 13001, 2009.
- [Basiruddin 10] S K Basiruddin, Arindam Saha, Narayan Pradhan et Nikhil R Jana. *Advances in Coating Chemistry in Deriving Soluble Functional Nanoparticle*. The Journal of Physical Chemistry C, vol. 114, no. 25, pages 11009–11017, 2010.
- [Bass 09] M. Bass, C. DeCusatis, J. Enoch, V. Lakshminarayanan, G. Li, C. MacDonald, V. Mahajan et E. Van Stryland. Handbook of Optics, Third Edition Volume IV : Optical Properties of Materials, Nonlinear Optics, Quantum Optics. Handbook of Optics. McGraw-Hill Education, 2009.
- [Bersohn 66] R. Bersohn, Y.-H. Pao et H. L. Frisch. *Double Quantum Light Scattering by Molecules*. Journal of Chemical Physics, vol. 45, 1966.
- [Bierlein 89] John D Bierlein et Herman Vanherzeele. *Potassium titanyl phosphate : properties and new applications*. Journal of the Optical Society of America B, vol. 6, no. 4, pages 622–633, 1989.
- [Bonacina 07] L. Bonacina, Y. Mugnier, F. Courvoisier, R. Le Dantec, J. Extermann, Y. Lambert, V. Boutou, C. Galez et J.-P. Wolf. *Polar Fe(IO₃)₃ nanocrystals as local probes for nonlinear microscopy*. Applied Physics B, vol. 87, no. 3, pages 399–403, March 2007.
- [Bonacina 12] Luigi Bonacina. *Nonlinear Nanomedicine : Harmonic Nanoparticles toward Targeted Diagnosis and Therapy*. Molecular Pharmaceutics, vol. 10, no. 3, pages pp 783–792, 2012.
- [Bouzigues 11] Cedric Bouzigues, Thierry Gacoin et Antigoni Alexandrou. *Biological Applications of Rare-Earth Based Nanoparticles*. ACS Nano, vol. 5, no. 11, pages 8488–8505, 2011.
- [Boyd 92] Robert W. Boyd. Nonlinear Optics. New York, academic p edition, 1992.

- [Brasselet 98] S. Brasselet et J. Zyss. *Multipolar molecules and multipolar fields : probing and controlling the tensorial nature of nonlinear molecular media*. Journal of Optical Society of America B, vol. 15, pages 257–288, 1998.
- [Brasselet 04] Sophie Brasselet, Véronique Le Floch, François Treussart, Joseph Zyss, Estelle Botzung-appert et Alain Ibanez. *In Situ Diagnostics of the Crystalline Nature of Single Organic Nanocrystals by Nonlinear Microscopy*. Physical Review Letters, vol. 92, no. 20, page 207401, 2004.
- [Brasselet 10] S Brasselet et J Zyss. *Nano-crystals for quadratic nonlinear imaging : characterization and applications*. In Y. Masuda, editeur, Nanocrystals, chapitre 11, pages 249–270. 2010.
- [Campagnola 03] Paul J Campagnola et Leslie M Loew. *Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms*. Nature biotechnology, vol. 21, no. 11, pages 1356–60, November 2003.
- [Catalan 09] Gustau Catalan et James F. Scott. *Physics and Applications of Bismuth Ferrite*. Advanced Materials, vol. 21, no. 24, pages 2463–2485, June 2009.
- [Chang 08] Yi-Ren Chang, Hsu-Yang Lee, Kowa Chen, Chun-Chieh Chang, Dung-Sheng Tsai, Chi-Cheng Fu, Tsong-Shin Lim, Yan-Kai Tzeng, Chia-Yi Fang, Chau-Chung Han, Huan-Cheng Chang et Wunshain Fann. *Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds*. Nature nanotechnology, vol. 3, no. 5, pages 284–288, May 2008.
- [Chatterjee 08] Dev K Chatterjee, Abdul J Rufaihah et Yong Zhang. *Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals*. Biomaterials, vol. 29, no. 7, pages 937–943, 2008.
- [Chen 11] Haiyan Chen, Yixuan Zhang et Yanling Lu. *Nanoscale potassium niobate crystal structure and phase transition*. Nanoscale Research Letters, vol. 6, no. 1, pages 1–6, 2011.
- [Ciofani 10] G Ciofani, S Danti, S Moscato, L Albertazzi, D DAlessandro, D Dinucci, F Chiellini, M Petrini et A Menciassi. *Preparation of stable dispersion of barium titanate nanoparticles : Potential applications in biomedicine*. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, vol. 76, no. 2, pages 535–543, 2010.
- [Ciofani 13] Gianni Ciofani, Leonardo Ricotti, Claudio Canale, Delfo DAlessandro, Stefano Berrettini, Barbara Mazzolai et Virgilio Mattoli. *Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells*. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, vol. 102, no. 0, pages 312–320, 2013.
- [Clays 91] K. Clays et A. Persoons. *Hyper-Rayleigh Scattering in solution*. Physical Review Letters, vol. 66, 1991.
- [Couvreur 06] Patrick Couvreur et Christine Vauthier. *Nanotechnology : Intelligent Design to Treat Complex Disease*. Pharmaceutical Research, vol. 23, no. 7, pages 1417–1450, 2006.
- [Cyvin 65] S J Cyvin, J E Rauch et J C Decius. *Theory of Hyper-Raman Effects (Nonlinear Inelastic Light Scattering) : Selection Rules and Depolarization Ratios for the Second-Order Polarizability*. The Journal of Chemical Physics, vol. 43, no. 11, pages 4083–4095, 1965.
- [Delahaye 09] Emilie Delahaye, Nicolas Sandeau, Yi Tao, Sophie Brasselet et Rene Clement. *Synthesis and Second Harmonic Generation Microscopy of Nonlinear Optical Efficient Hybrid Nanoparticles Embedded in Polymer Films. Evidence for Intra- and Internanoparticles Orientational Synergy*. The Journal of Physical Chemistry C, vol. 113, no. 21, pages 9092–9100, 2009.
- [Dempsey 12] William P. Dempsey, Scott E. Fraser et Periklis Pantazis. *SHG nanoprobe : Advancing harmonic imaging in biology*. BioEssays, vol. 34, no. 5, pages 351–360, March 2012.

- [Deniset-Besseau 09] Ariane Deniset-Besseau, Julien Duboisset, Emmanuel Benichou, François Hache, Pierre-François Brevet et Marie-Claire Schanne-Klein. *Measurement of the second-order hyperpolarizability of the collagen triple helix and determination of its physical origin*. The journal of physical chemistry. B, vol. 113, no. 40, pages 13437–45, October 2009.
- [Denk 90] W Denk, J H Strickler et W W Webb. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, vol. 248, no. 4951, pages 73–76, April 1990.
- [Dong 11] Ning-Ning Dong, Marco Pedroni, Fabio Piccinelli, Giamaica Conti, Andrea Sbarbati, Juan Enrique Ramírez-Hernández, Laura Martínez Maestro, Maria Carmen la Cruz, Francisco Sanz-Rodriguez, Angeles Juarranz, Feng Chen, Fiorenzo Vetrone, John A Capobianco, José García Solé, Marco Bettinelli, Daniel Jaque et Adolfo Speghini. *NIR-to-NIR Two-Photon Excited CaF₂:Tm³⁺, Yb³⁺ Nanoparticles : Multifunctional Nanoprobes for Highly Penetrating Fluorescence Bio-Imaging*. ACS Nano, vol. 5, no. 11, pages 8665–8671, 2011.
- [Drummen 12] Gregor P C Drummen. *Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques ; Illuminating Biological and Biomedical Research*. Molecules, vol. 17, no. 12, pages 14067–14090, 2012.
- [Duboisset 09] J Duboisset, I Russier-Antoine, E Benichou, G Bachelier, Ch. Jonin et P F Brevet. *Single Metallic Nanoparticle Sensitivity with Hyper Rayleigh Scattering*. The Journal of Physical Chemistry C, vol. 113, no. 31, pages 13477–13481, 2009.
- [Dutto 11] F Dutto, C Raillon, K Schenk et A Radenovic. *Nonlinear optical response in single alkaline niobate nanowires*. Nano Letters, vol. 11, no. 6, pages 2517–21, June 2011.
- [El Kass 12] Moustafa El Kass. *Nanocristaux optiquement non linéaires pour des applications en imagerie biologique : synthèse et caractérisations d'iodate de fer en microémulsions*. Thèse de Doctorat, Grenoble, 2012.
- [Ellis-Davies 11] Graham C R Ellis-Davies. *Two-photon microscopy for chemical neuroscience*. ACS chemical neuroscience, vol. 2, no. 4, pages 185–197, April 2011.
- [Erogbogbo 08] Folarin Erogbogbo, Ken-Tye Yong, Indrajit Roy, GaiXia Xu, Paras N Prasad et Mark T Swihart. *Biocompatible Luminescent Silicon Quantum Dots for Imaging of Cancer Cells*. ACS Nano, vol. 2, no. 5, pages 873–878, 2008.
- [Extermann 09] Jerome Extermann, Luigi Bonacina, Enrique Cuña, Christelle Kasparian, Yannick Mugnier, Thomas Feurer et Jean-Pierre Wolf. *Nanodoublers as deep imaging markers for multi-photon microscopy*. Optics express, vol. 17, no. 17, pages 15342–9, August 2009.
- [Faklaris 09] Orestis Faklaris. *Photoluminescent diamond nanoparticles as labels in cells : study of their optical properties and investigation of their cellular uptake mechanism*. Thèse de Doctorat, ENS Cachan, 2009.
- [Fiole 11] Daniel Fiole, Julien Douady, Aurélie Cleret, Kévin Garraud, Jacques Mathieu, Anne Quesnel-Hellmann et Jean-Nicolas Tournier. *Multimodal 4D imaging of cell-pathogen interactions in the lungs provides new insights into pulmonary infections*. In Advanced Microscopy Techniques II, page 808618. Optical Society of America, 2011.
- [Folick 11] Andrew Folick, Wei Min et Meng C Wang. *Label-free imaging of lipid dynamics using Coherent Anti-stokes Raman Scattering (CARS) and Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy*. Current Opinion in Genetics & Development, vol. 21, no. 5, pages 585–590, 2011.
- [Forget 08] S Forget. *Coupe longitudinale d'un faisceau gaussien autour du waist*. Rapport technique, SFO, 2008.
- [Franken 61] Franken, Hill, Peters et Weinreich. *Generation of Optical Harmonics*. Physical Review Letters, vol. 7, no. 4, pages 118–119, 1961.
- [Fujino 07] S Fujino, M Murakami, S.-H. Lim, M Wuttig, L G Salamanca-Riba et I Takeuchi. *Ferroelectric properties of multiphase Bi-Fe-O thin films*. Solid State Ionics, vol. 178, no. 21, pages 1257–1261, 2007.

- [Gailhouste 10] Luc Gailhouste, Yann Le Grand, Christophe Odin, Dominique Guyader, Bruno Turlin, Frédéric Ezan, Yoann Désille, Thomas Guilbert, Anne Bessard, Christophe Frémin, Nathalie Theret et Georges Baffet. *Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy : A new tool in the assessment of liver fibrosis*. Journal of Hepatology, vol. 52, no. 3, pages 398–406, 2010.
- [Gao 07] F Gao, X Y Chen, K B Yin, S Dong, Z F Ren, F Yuan, T Yu, Z G Zou et J.-M. Liu. *Visible-Light Photocatalytic Properties of Weak Magnetic BiFeO₃ Nanoparticles*. Advanced Materials, vol. 19, no. 19, pages 2889–2892, 2007.
- [Geissbuehler 12] Matthias Geissbuehler, Luigi Bonacina, Vladislav Shcheslavskiy, Noelia L Bocchio, Stefan Geissbuehler, Marcel Leutenegger, Iwan Märki, Jean-Pierre Wolf et Theo Lasser. *Nonlinear Correlation Spectroscopy (NLCS)*. Nano Letters, vol. 12, no. 3, pages 1668–1672, 2012.
- [Gibson 11] Emily Gibson, Omid Masihzadeh, Tim Lei, David Ammar et Malik Kahook. *Multi-photon microscopy for ophthalmic imaging*. Journal of ophthalmology, vol. 2011, page 870879, January 2011.
- [Gnach 12] Anna Gnach et Artur Bednarkiewicz. *Lanthanide-doped up-converting nanoparticles : Merits and challenges*. Nano Today, vol. 7, no. 6, pages 532–563, 2012.
- [Gomes 11] Suzete Gomes, Cecilia Stahl Vieira, Diogo B Almeida, Jacenir R Santos-Mallet, Rubem F S Menna-Barreto, Carlos L Cesar et Denise Feder. *CdTe and CdSe quantum dots cytotoxicity : a comparative study on microorganisms*. Sensors (Basel, Switzerland), vol. 11, no. 12, pages 11664–78, January 2011.
- [Grange 11] Rachel Grange, Thomas Lanvin, Chia-Lung Hsieh, Ye Pu et Demetri Psaltis. *Imaging with second-harmonic radiation probes in living tissue*. Biomedical Optics Express, vol. 2, no. 9, pages 2532–2539, September 2011.
- [Haase 11] Markus Haase et Helmut Schäfer. *Upconverting Nanoparticles*. Angewandte Chemie International Edition, vol. 50, no. 26, pages 5808–5829, 2011.
- [Hardman 06] Ron Hardman. *A Toxicologic Review of Quantum Dots : Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors*. Environmental Health Perspectives, vol. 114, no. 2, pages 165–172, February 2006.
- [Heesink 93] GJT Heesink, AGT Ruiter, N F Van Hulst et B Bölger. *Determination of hyperpolarizability tensor components by depolarized hyper Rayleigh scattering*. Physical Review Letters, vol. 71, no. 7, pages 999–1002, 1993.
- [Hemmilä 05] I Hemmilä et V Laitala. *Progress in Lanthanides as Luminescent Probes*. Journal of Fluorescence, vol. 15, no. 4, pages 529–542, 2005.
- [Hendrickx 98] Eric Hendrickx, Koen Clays et André Persoons. *Hyper-Rayleigh Scattering in Isotropic Solution*. Accounts of Chemical Research, vol. 31, no. 10, pages 675–683, 1998.
- [Hsieh 09] Chia-Lung Hsieh, Rachel Grange, Ye Pu et Demetri Psaltis. *Three-dimensional harmonic holographic microcopy using nanoparticles as probes for cell imaging*. Optics express, vol. 17, no. 4, pages 2880–91, February 2009.
- [Hsieh 10a] Chia-Lung Hsieh, Rachel Grange, Ye Pu et Demetri Psaltis. *Bioconjugation of barium titanate nanocrystals with immunoglobulin G antibody for second harmonic radiation imaging probes*. Biomaterials, vol. 31, no. 8, pages 2272–2277, 2010.
- [Hsieh 10b] Chia-Lung Hsieh, Ye Pu, Rachel Grange, Grégoire Laporte et Demetri Psaltis. *Imaging through turbid layers by scanning the phase conjugated second harmonic radiation from a nanoparticle*. Optics Express, vol. 18, no. 20, pages 20723–20731, September 2010.
- [Huang 06] Limin Huang, Zhuoying Chen, James D Wilson, Sarbajit Banerjee, Richard D Robinson, Irving P Herman, Robert Laibowitz et Stephen OBrien. *Barium titanate nanocrystals and nanocrystal thin films : Synthesis, ferroelectricity, and dielectric properties*. Journal of Applied Physics, vol. 100, no. 3, pages 34316–343110, 2006.
- [Hui 10] Yuen Yung Hui, Chia-Liang Cheng et Huan-Cheng Chang. *Nanodiamonds for optical bioimaging*. Journal of Physics D : Applied Physics, vol. 43, no. 37, page 374021, 2010.

- [Huyskens 98] François L. Huyskens, Pierre L. Huyskens et André P. Persoons. *Solvent dependence of the first hyperpolarizability of p-nitroanilines : Differences between nonspecific dipole-dipole interactions and solute-solvent H-bonds*. J. Chem. Phys., vol. 108, page 8161, 1998.
- [Idris 09] Niagara Muhammad Idris, Zhengquan Li, Lei Ye, Eugene Kwang Wei Sim, Ratha Mahendran, Paul Chi-Lui Ho et Yong Zhang. *Tracking transplanted cells in live animal using upconversion fluorescent nanoparticles*. Biomaterials, vol. 30, no. 28, pages 5104–5113, 2009.
- [Ihlefeld 07] J F Ihlefeld, A Kumar, V Gopalan, D G Schlom, Y B Chen, X Q Pan, T Heeg, J Schubert, X Ke, P Schiffer, J Orenstein, L W Martin, Y H Chu et R Ramesh. *Adsorption-controlled molecular-beam epitaxial growth of BiFeO₃*. Applied Physics Letters, vol. 91, no. 7, pages 71922–71923, 2007.
- [Jackson 75] J.D. Jackson. Classical Electrodynamics. New york, wiley edition, 1975.
- [Jacobsohn Eilon 01] M. Jacobsohn Eilon, T. Mokari et U Banin. *Surface exchange effect on hyper Rayleigh scattering in CdSe nanocrystals*. Journal of Physical Chemistry B, vol. 105, 2001.
- [Jacobsohn 00] M Jacobsohn et U Barin. *Size-dependance of Second Harmonic Generation in CdSe Nanocrystal quantum Dots*. The Journal of Physical Chemistry B, vol. 104, no. 1, pages 1–5, 2000.
- [Jiang 10] Shan Jiang et Yong Zhang. *Upconversion Nanoparticle-Based FRET System for Study of siRNA in Live Cells*. Langmuir, vol. 26, no. 9, pages 6689–6694, 2010.
- [Kachynski 08] Aliaksandr V Kachynski, Andrey N Kuzmin, Marcin Nyk, Indrajit Roy et Paras N Prasad. *Zinc Oxide Nanocrystals for Nonresonant Nonlinear Optical Microscopy in Biology and Medicine*. The Journal of Physical Chemistry C, vol. 112, no. 29, pages 10721–10724, 2008.
- [Kartavtseva 07] M S Kartavtseva, O Yu. Gorbenko, A R Kaul, T V Murzina, S A Savinov et O A Aktsipetrov. *Strain-induced effects in phase transitions in thin films of multiferroic BiFeO₃ probed by optical second-harmonic generation*. Journal of Materials Research, vol. 22, no. 08, pages 2063–2067, 2007.
- [Kauranen 96] Martti Kauranen et André Persoons. *Theory of polarization measurements of second-order nonlinear light scattering*. Journal of Chemical Physics, vol. 104 (10), page 3445, 1996.
- [Kielich 68] S Kielich. *DC electric field-induced optical second harmonic generation by interacting multipolar molecules*. Chemical Physics Letters, vol. 2, no. 8, pages 569–572, 1968.
- [Kim 09] Sang-Hyun Kim, Jae-Woo Jeong, Jeong-Woo Lee et Sung-Chul Shin. *Enhancement of saturation magnetization in epitaxial (111) BiFeO₃ films by magnetic annealing*. Thin Solid Films, vol. 517, no. 8, pages 2749–2752, 2009.
- [Kim 13] D.H. Kim et D Lim. *Structural transition in epitaxially-strained BiFeO₃ thin films studied by using second harmonic generation*. Journal of the Korean Physical Society, vol. 62, no. 5, pages 734–738, 2013.
- [Kirejev 12] V. Kirejev, S. Gulbrand, J. Borglin, C. Simonsson et M. B. Ericson. *Multiphoton microscopy - a powerful tool in skin research and topical drug delivery science*. Journal of drug delivery science and technology, vol. 22, no. 3, pages 250–259, 2012.
- [Klein 03] R.S. Klein, G.E. Kugel, A. Maillard, K. Polgár et A. Péter. *Absolute non-linear optical coefficients of LiNbO₃ for near stoichiometric crystal compositions*. Optical Materials, vol. 22, no. 2, pages 171–174, 2003.
- [Klingshirn 07] C Klingshirn. *ZnO : Material, Physics and Applications*. ChemPhysChem, vol. 8, no. 6, pages 782–803, 2007.
- [König 97] K König, P T C So, W W Mantulin et E Gratton. *Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes*. Optics Letters, vol. 22, no. 2, pages 135–136, January 1997.

- [König 00] K König. *Multiphoton microscopy in life sciences*. Journal of Microscopy, vol. 200, no. 2, pages 83–104, 2000.
- [Kumar 08] Amit Kumar, Ram C. Rai, Nikolas J. Podraza, Sava Denev, Mariola Ramirez, Ying-Hao Chu, Lane W. Martin, Jon Ihlefeld, T. Heeg, J. Schubert, Darrell G. Schlom, J. Orenstein, R. Ramesh, Robert W. Collins, Janice L. Musfeldt et Venkatraman Gopalan. *Linear and nonlinear optical properties of BiFeO₃*. Applied Physics Letters, vol. 92, no. 12, page 121915, 2008.
- [Kuzyk 98] MG Kuzyk et CW Dirk. *Characterization Techniques and Tabulations for Organic Non Linear Optical Materials*. New York, dekker edition, 1998.
- [Ladj 12] Rachid Ladj, Moustafa El Kass, Yannick Mugnier, Ronan Le Dantec, Hatem Fessi, Christine Galez et Abdelhamid Elaissari. *SHG Active Fe(IO₃)₃ Particles : From Spherical Nanocrystals to Urchin-Like Microstructures through the Additive-Mediated Microemulsion Route*. Crystal Growth & Design, vol. 12, no. 11, pages 5387–5395, 2012.
- [Ladj 13] R. Ladj, A. Bitar, M. Eissa, Y. Mugnier, R. Le Dantec, H. Fessi et A. Elaissari. *Individual inorganic nanoparticles : preparation, functionalization and in vitro biomedical diagnostic applications*. Journal of Materials Chemistry B, 2013.
- [Lahmani 07] M. Lahmani, P. Boisseau et P. Houdy. *Nanosciences : nanobiotechnologies et nanobiologie*. Belin edition, 2007.
- [Larson 03] Daniel R Larson, Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, Stephen W Clark, Marcel P Bruchez, Frank W Wise et Watt W Webb. *Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo*. Science, vol. 300, no. 5624, pages 1434–1436, 2003.
- [Le Dantec 11] R. Le Dantec, Y. Mugnier, G. Djanta, L. Bonacina, J Extermann, L. Badie, C. Joulaud, M. Gerrmann, D. Rytz, JP. Wolf et C. Galez. *Ensemble and Individual Characterization of the Nonlinear Optical Properties of ZnO and BaTiO₃ Nanocrystals*. The Journal of Physical Chemistry C, vol. 115, no. 31, pages 15140–15146, 2011.
- [Le Xuan 08] Loc Le Xuan, Chunyuan Zhou, Abdallah Slablab, Dominique Chauvat, Cédric Tard, Sandrine Perruchas, Thierry Gacoin, Philippe Villeval, Jean-François Roch et Xuan Loc Le. *Photostable second-harmonic generation from a single KTiOPO₄ nanocrystal for nonlinear microscopy*. Small, vol. 4, no. 9, pages 1332–6, September 2008.
- [Lebeugle 07a] D Lebeugle. *Etude de la coexistence du magnétisme et de la ferroélectricité dans les composés multiferroïques BiFeO₃ et Bi_{0.45}Dy_{0.55}FeO₃*. Thèse de Doctorat, Université Paris Sud - Paris XI, 2007.
- [Lebeugle 07b] D Lebeugle, D Colson, A Forget et M Viret. *Very large spontaneous electric polarization in BiFeO₃ single crystals at room temperature and its evolution under cycling fields*. Applied Physics Letters, vol. 91, no. 2, page 22907, 2007.
- [Lecoq 11] Jérôme Lecoq, Alexandre Parpaleix, Emmanuel Roussakis, Mathieu Ducros, Yannick Goulam Houssen, Sergei A Vinogradov et Serge Charpak. *Simultaneous two-photon imaging of oxygen and blood flow in deep cerebral vessels*. Nature Medicine, vol. 17, no. 7, pages 893–898, 2011.
- [Lemaillet 07] Paul Lemaillet, Fabrice Pellen, Sylvain Rivet, Bernard Le Jeune et Jack Cariou. *Optimization of a dual-rotating-retarder polarimeter designed for hyper-Rayleigh scattering*. Journal of the Optical Society of America B, vol. 24, no. 3, page 609, 2007.
- [Levine 75] B F Levine et C G Bethea. *Second and third order hyperpolarizabilities of organic molecules*. The Journal of Chemical Physics, vol. 63, no. 6, pages 2666–2682, 1975.
- [Lewinski 08] Nastassja Lewinski, Vicki Colvin et Rebekah Drezek. *Cytotoxicity of Nanoparticles*. Small, vol. 4, no. 1, pages 26–49, 2008.
- [Lim 06] Shuang Fang Lim, Robert Riehn, William S Ryu, Nora Khanarian, Chih-kuan Tung, David Tank et Robert H Austin. *In Vivo and Scanning Electron Microscopy Imaging*

- of Upconverting Nanophosphors in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Letters*, vol. 6, no. 2, pages 169–174, 2006.
- [Lin 12] Yu-Chung Lin, Elena Perevedentseva, Lin-Wei Tsai, Kuan-Ting Wu et Chia-Liang Cheng. *Nanodiamond for intracellular imaging in the microorganisms in vivo*. *Journal of Biophotonics*, vol. 5, no. 11-12, pages 838–847, 2012.
- [Liu 11] Qian Liu, Yun Sun, Tianshe Yang, Wei Feng, Chenguang Li et Fuyou Li. *Sub-10 nm Hexagonal Lanthanide-Doped NaLuF₄ Upconversion Nanocrystals for Sensitive Bioimaging in Vivo*. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 43, pages 17122–17125, 2011.
- [Liu 12] Qian Liu, Tianshe Yang, Wei Feng et Fuyou Li. *Blue-Emissive Upconversion Nanoparticles for Low-Power-Excited Bioimaging in Vivo*. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, no. 11, pages 5390–5397, 2012.
- [Long 07] J P Long, B S Simpkins, D J Rowenhorst et P E Pehrsson. *Far-field Imaging of Optical Second-Harmonic Generation in Single GaN Nanowires*. *Nano Letters*, vol. 7, no. 3, pages 831–836, 2007.
- [Ma 12] Kai Ma, Hiroaki Sai et Ulrich Wiesner. *Ultrasmall Sub-10 nm Near-Infrared Fluorescent Mesoporous Silica Nanoparticles*. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, no. 32, pages 13180–13183, 2012.
- [Magouroux 12] Thibaud Magouroux, Jerome Extermann, Pernilla Hoffmann, Yannick Mugnier, Ronan Le Dantec, Marisa E Jaconi, Christelle Kasparian, Daniel Ciepielewski, Luigi Bonacina et Jean-Pierre Wolf. *High-Speed Tracking of Murine Cardiac Stem Cells by Harmonic Nanodoublers*. *Small*, vol. 8, no. 17, pages 2752–2756, 2012.
- [Mahou 11] Pierre Mahou, Nicolas Olivier, Guillaume Labroille, Louise Duloquin, Jean-Marc Sintès, Nadine Peyri  ras, Renaud Legouis, Delphine D  barre et Emmanuel Beaurepaire. *Combined third-harmonic generation and four-wave mixing microscopy of tissues and embryos*. *Biomedical Optics Express*, vol. 2, no. 10, pages 2837–2849, October 2011.
- [Maison 03] Wongduan Maison, Reinhard Kleeberg, Robert B Heimann et Sukon Phanichphant. *Phase content, tetragonality, and crystallite size of nanoscaled barium titanate synthesized by the catecholate process : effect of calcination temperature*. *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 23, no. 1, pages 127–132, 2003.
- [Mason 99] W.T. Mason. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. London, 2nd edition, 1999.
- [Matsuura 10] H Matsuura, H Yokota, R Haumont, J M Kiat et Y Uesu. *SHG Microscope Observations of Domain Structures of Multiferroic BiFeO₃ Single Crystal*. *Ferroelectrics*, vol. 410, no. 1, pages 59–62, 2010.
- [McCarthy 12] Sarah McCarthy, Gemma-Louise Davies et Yurii Gun’ko. *Preparation of multifunctional nanoparticles and their assemblies*. *Nature Protocols*, vol. 7, no. 9, pages 1677–1693, 2012.
- [Medintz 05] Igor L Medintz, H Tetsuo Uyeda, Ellen R Goldman et Hedi Mattoussi. *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*. *Nature materials*, vol. 4, no. 6, pages 435–46, June 2005.
- [Mialon 10] G. Mialon, S. T  rkcan, G. Dantelle, D. P. Collins, M. Hadjipanayi, R.A. Taylor, T. Gacoin, A. Alexandrou, JP. Boilot et S. Tu. *High Up-Conversion Efficiency of YVO₄ : Yb,Er Nanoparticles in Water down to the Single-Particle Level*. *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, no. 51, pages 22449–22454, 2010.
- [Michalet 05] X Michalet, F F Pinaud, L A Bentolila, J M Tsay, S Doose, J J Li, G Sundaresan, A M Wu, S S Gambhir et S Weiss. *Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics*. *Science*, vol. 307, no. 5709, pages 538–544, 2005.
- [Mochalin 12] Vadym N Mochalin, Olga Shenderova, Dean Ho et Yury Gogotsi. *The properties and applications of nanodiamonds*. *Nature nanotechnology*, vol. 7, no. December, pages 11–23, 2012.

- [Mohan 10] Nitin Mohan, Chao-Sheng Chen, Hsiao-Han Hsieh, Yi-Chun Wu et Huan-Cheng Chang. *In Vivo Imaging and Toxicity Assessments of Fluorescent Nanodiamonds in Caenorhabditis elegans*. Nano Letters, vol. 10, no. 9, pages 3692–3699, 2010.
- [Mohanty 12] Debasish Mohanty, Girija S Chaubey, Amin Yourdkhani, Shiva Adireddy, Gabriel Caruntu et John B Wiley. *Synthesis and piezoelectric response of cubic and spherical LiNbO₃ nanocrystals*. RSC Advances, vol. 2, no. 5, pages 1913–1916, 2012.
- [Moreau 71] J M Moreau, C Michel, R Gerson et W J James. *Ferroelectric BiFeO₃ X-ray and neutron diffraction study*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, vol. 32, no. 6, pages 1315–1320, 1971.
- [Mugnier 11] Y. Mugnier, L. Houf, M. El-Kass, R. Le Dantec, R. Hadji, B. Vincent, G. Djanta, L. Badie, C. Joulaud, J. Eschbach, D. Rouxel et C. Galez. *In Situ Crystallization and Growth Dynamics of Acentric Iron Iodate Nanocrystals in w/o Microemulsions Probed by Hyper-Rayleigh Scattering Measurements*. The Journal of Physical Chemistry C, vol. 115, no. 1, pages 23–30, 2011.
- [Nakayama 07] Yuri Nakayama, Peter J. Pauzauskie, Aleksandra Radenovic, Robert M. Onorato, Richard J. Saykally, Jan Liphardt et Yang Peidong. *Tunable nanowire nonlinear optical probe*. Nature, vol. 447, no. 7148, pages 1098–1101, 2007.
- [Nappa 05] J Nappa, G Revillod, I Russier-Antoine, E Benichou, C Jonin et P F Brevet. *Electric dipole origin of the second harmonic generation of small metallic particles*. Physical Review B, vol. 71, no. 16, page 165407, 2005.
- [Nava 10] RubenG. Nava, Wenjun Li, AndrewE. Gelman, AlexanderS. Krupnick, MarkJ. Miller et Daniel Kreisel. *Two-photon microscopy in pulmonary research*. Seminars in Immunopathology, vol. 32, no. 3, pages 297–304, 2010.
- [Nikogosyan 05] David Nikogosyan. Nonlinear optical crystals : a complete survey. New York, 2005.
- [Nyk 08] Marcin Nyk, Rajiv Kumar, Tymish Y Ohulchanskyy, Earl J Bergey et Paras N Prasad. *High Contrast in Vitro and in Vivo Photoluminescence Bioimaging Using Near Infrared to Near Infrared Up-Conversion in Tm³⁺ and Yb³⁺ Doped Fluoride Nanophosphors*. Nano Letters, vol. 8, no. 11, pages 3834–3838, 2008.
- [Olivier 10] Nicolas Olivier, Miguel A Luengo-Oroz, Louise Duloquin, Emmanuel Faure, Thierry Savy, Israël Veilleux, Xavier Solinas, Delphine Débarre, Paul Bourguine, Andrés Santos, Nadine Peyri  ras et Emmanuel Beaurepaire. *Cell Lineage Reconstruction of Early Zebrafish Embryos Using Label-Free Nonlinear Microscopy*. Science, vol. 329, no. 5994, pages 967–971, 2010.
- [Ostroverkhov 00] V Ostroverkhov, R G Petschek et K D Singer. *Measurements of the hyperpolarizability tensor by means of hyper-Rayleigh scattering*. Journal of the Optical Society of America B, vol. 4330, 2000.
- [Ow 05] Hooisweng Ow, Daniel R Larson, Mamta Srivastava, Barbara A Baird, Watt W Webb et Ulrich Wiesner. *Bright and Stable Core-Shell Fluorescent Silica Nanoparticles*. Nano Letters, vol. 5, no. 1, pages 113–117, 2005.
- [Pantazis 10] Periklis Pantazis, James Maloney, David Wu et Scott E Fraser. *Second harmonic generating (SHG) nanoprobe for in vivo imaging*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, no. 33, pages 14535–40, August 2010.
- [Park 10] Tae-Jin Park, Georgia C Papaefthymiou, Arthur J Viescas, Yongjae Lee, Hongjun Zhou et Stanislaus S Wong. *Composition-dependent magnetic properties of BiFeO₃-BaTiO₃ solid solution nanostructures*. Physical Review B, vol. 82, no. 2, page 24431, 2010.
- [Paumier 08] G. Paumier, P. Ronan, NIH, AJ Fijalkowski, J Walker, MD Jones, T Heal, M Ruiz, Science Primer (National Center for Biotechnology Information), Liquid2003, A Nordmann et The Tango! Desktop Project. *Biological and technological scales compared*, 2008.

- [Pavlova 10] Ina Pavlova, Kelly R Hume, Stephanie A Yazinski, Rachel M Peters, Robert S Weiss et Watt W Webb. *Multiphoton microscopy as a diagnostic imaging modality for lung cancer*. SPIE Proceedings, pages 756917–756918, 2010.
- [Perry 12] SethW. Perry, RyanM. Burke et EdwardB. Brown. *Two-Photon and Second Harmonic Microscopy in Clinical and Translational Cancer Research*. Annals of Biomedical Engineering, vol. 40, no. 2, pages 277–291, 2012.
- [Petrov 02] D V Petrov, B S Santos, G A L Pereira et C de Mallo Donega. *Size and Band-gap dependences of the First Hyperpolarizability of Cd(x)Zn(1-x)S Nanocrystals*. Journal of Physical Chemistry B, vol. 106, 2002.
- [Pu 10] Ye Pu, Rachel Grange, Chia-Lung Hsieh et Demetri Psaltis. *Nonlinear Optical Properties of Core-Shell Nanocavities for Enhanced Second-Harmonic Generation*. Physical Review Letters, vol. 104, no. 20, pages 1–4, May 2010.
- [Rameshwar 06] Tatavarty Rameshwar, Shashadhar Samal, Sungyun Lee, Suhan Kim, Jaeweon Cho et In S Kim. *Determination of the Size of Water-Soluble Nanoparticles and Quantum Dots by Field-Flow Fractionation*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, vol. 6, no. 8, pages 2461–2467, 2006.
- [Resch-Genger 08] Ute Resch-Genger, Markus Grabolle, Sara Cavaliere-jaricot, Roland Nitschke et Thomas Nann. *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. Nature Methods, vol. 5, no. 9, 2008.
- [Revillod 06] Guillaume Revillod. *Diffusion hyper Rayleigh des assemblages moléculaires*. Thèse de Doctorat, Université Lyon I, 2006.
- [Revillod 08] Guillaume Revillod, Julien Duboisset, Isabelle Russier-antoine, Emmanuel Benichou, Guillaume Bachelier, Christian Jonin et Claude Bernard Lyon. *Multipolar Contributions to the Second Harmonic Response from Mixed DiA-SDS Molecular Aggregates*. Journal of Physical Chemistry C, pages 2716–2723, 2008.
- [Rivera 97] J.-P. Rivera et H Schmid. *On the birefringence of magnetoelectric BiFeO₃*. Ferroelectrics, vol. 204, no. 1, pages 23–33, 1997.
- [Rodriguez 09] E.V. Rodriguez, C. B. de Araujo, A M Brito-Silva, V I Ivanenko et A A Lipovskii. *Hyper-Rayleigh scattering from BaTiO₃ and PbTiO₃ nanocrystals*. Chemical Physics Letters, vol. 467, pages 335–338, 2009.
- [Roke 12] Sylvie Roke et Grazia Gonella. *Nonlinear light scattering and spectroscopy of particles and droplets in liquids*. Annual review of physical chemistry, vol. 63, pages 353–378, January 2012.
- [Roy 10] Shibsekhar Roy, Chandra K Dixit, Robert Woolley, Brian D MacCraith, Richard O’Kennedy et Colette McDonagh. *Novel multiparametric approach to elucidate the surface amine-silanization reaction profile on fluorescent silica nanoparticles*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 26, no. 23, pages 18125–34, December 2010.
- [Ruda 07] H E Ruda et A Shik. *Nonlinear optical phenomena in nanowires*. Journal of Applied Physics, vol. 101, no. 3, pages 34312–34314, 2007.
- [Russier-Antoine 07] I Russier-Antoine, E Benichou, G Bachelier, C Jonin et P F Brevet. *Multipolar Contributions of the Second Harmonic Generation from Silver and Gold Nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, vol. 111, no. 26, pages 9044–9048, 2007.
- [Sandeau 07] N Sandeau, L Le Xuan, D Chauvat, C Zhou, J Roch et Domaine St J. *Defocused imaging of second harmonic generation from a single nanocrystal*. Optics Express, vol. 15, no. 24, pages 12–20, 2007.
- [Santos 00] B S Santos, G A L Pereira, D V Petrov et C De Mello Donega. *First hyperpolarizability of CdS nanoparticles studied by hyper-Rayleigh scattering*. Optics Communications, vol. 178, no. May, pages 187–192, 2000.

- [Schrand 09] Amanda M Schrand, Suzanne A Ciftan Hens et Olga A Shenderova. *Nanodiamond Particles : Properties and Perspectives for Bioapplications*. Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, vol. 34, no. 1-2, pages 18–74, 2009.
- [Segets 09] D. Segets, L. M. Tomalino, J Gradl et W Peukert. *Real time monitoring of the nucleation and growth of ZnO nanoparticles using an optical hyper-Rayleigh scattering*. Journal of Physical Chemistry C, vol. 113, no. 28, pages 11995–12001, 2009.
- [Serdiuk 12] T Serdiuk, S A Alekseev, V Lysenko, V A Skryshevsky et A G  lo  n. *Charge-driven selective localization of fluorescent nanoparticles in live cells*. Nanotechnology, vol. 23, no. 31, page 315101, 2012.
- [Shen 00] Yuzhen Shen, Jacek Swiatkiewicz, Jeff Winiarz, Przemyslaw Markowicz et Paras N Prasad. *Second-harmonic and sum-frequency imaging of organic nanocrystals with photon scanning tunneling microscope*. Applied Physics Letters, vol. 77, no. 19, pages 2946–2948, 2000.
- [Shoji 97] Ichiro Shoji, Takashi Kondo, Ayako Kitamoto, Masayuki Shirane et Ryoichi Ito. *Absolute scale of second-order nonlinear-optical coefficients*. Journal of the Optical Society of America B, vol. 14, no. 9, pages 2268–2294, September 1997.
- [Shotton 89] David M Shotton. *Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens*. Journal of Cell Science, vol. 94, pages 175–206, 1989.
- [Sibbett 12] W Sibbett, A A Lagatsky et C T A Brown. *The development and application of femtosecond laser systems*. Optics Express, vol. 20, no. 7, pages 6989–7001, March 2012.
- [Staedler 12] Davide Staedler, Thibaud Magouroux, Rachid Hadji, Cécile Joulaud, Jérôme Extermann, Sebastian Schwung, Sol  ne Passemard, Christelle Kasparian, Gareth Clarke, Mathias Germann, Ronan Le Dantec, Yannick Mugnier, Daniel Rytz, Daniel Ciepielewski, Christine Galez, Sandrine Gerber-Lemaire, Lucienne Juillerat-Jeanneret, Luigi Bonacina et Jean-Pierre Wolf. *Harmonic Nanocrystals for Biolabeling : A Survey of Optical Properties and Biocompatibility*. ACS Nano, vol. 6, no. 3, pages 2542–2549, 2012.
- [Supatto 11] Willy Supatto, Thai V Truong, Delphine D  barre et Emmanuel Beaurepaire. *Advances in multiphoton microscopy for imaging embryos*. Current Opinion in Genetics & Development, vol. 21, no. 5, pages 538–548, 2011.
- [Terhune 65] R W Terhune, P D Maker et C M Savage. *Measurements of Nonlinear Light Scattering*. Physical Review Letters, vol. 14, no. 17, pages 681–684, 1965.
- [Tong 11] Ling Tong et Ji-Xin Cheng. *Label-free imaging through nonlinear optical signals*. Materials Today, vol. 14, no. 6, pages 264–273, 2011.
- [Treussart 03] François Treussart, Estelle Botzung-Appert, Nguyet-Thanh Ha-Duong, Alain Ibanez, Jean-François Roch et Robert Pansu. *Second Harmonic Generation and Fluorescence of CMONS Dye Nanocrystals Grown in a Sol-Gel Thin Film*. ChemPhysChem, vol. 4, no. 7, pages 757–760, 2003.
- [Urban 12] B.E. Urban, P. Neogi, K. Senthilkumar, S.K. Rajpurohit, P. Jagadeeshwaran, Kim Seongcheol, Y. Fujita et A. Neogi. *Bioimaging Using the Optimized Nonlinear Optical Properties of ZnO Nanoparticles*. IEEE, vol. 18, no. 4, pages 1451 – 1456, 2012.
- [  uli   Viskota 12] Jelena   uli   Viskota, William P Dempsey, Scott E Fraser et Periklis Pantazis. *Surface functionalization of barium titanate SHG nanoprobe for in vivo imaging in zebrafish*. Nature Protocols, vol. 7, pages 1618–1633, 2012.
- [Verbiest 94] Verbiest, Clays, Samyn, Wolff, Reinhoudt et Persoons. *Investigation of the Hyperpolarizability in Organic Molecules from Dipolar to Octupolar Systems*. J. Am. Chem. Soc., vol. 116, pages 9320–9323, 1994.
- [Verbiest 09] T Verbiest, K Clays et V Rodriguez. *Second-order Nonlinear Optical Characterisation Techniques. An introduction*. 2009.

- [Vo-Dinh 04] Tuan Vo-Dinh et Barry R Masters. *Biomedical Photonics Handbook*. Journal of Biomedical Optics, vol. 9, no. 5, pages 1110–1111, 2004.
- [Volk 09] T Volk et M Wöhlecke. *Lithium Niobate : Defects, Photorefractive and Ferroelectric Switching*. Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [von der Kammer 11] Frank von der Kammer, Samuel Legros, Thilo Hofmann, Erik H Larsen et Katrin Loeschner. *Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 30, no. 3, pages 425–436, 2011.
- [Wang 96] Wang, Yan, Borguet et Eienthal. *Second Harmonic Generation from the surface of centrosymmetric particles in bulk solution*. Chemical Physics Letters, vol. 259, pages 15–20, 1996.
- [Wang 01] Gang Wang, George K L Wong et John B Ketterson. *Redetermination of Second-Order Susceptibility of Zinc Oxide Single Crystals*. Applied optics, vol. 40, no. 30, pages 5436–5438, October 2001.
- [Wang 03] J Wang, J B Neaton, H Zheng, V Nagarajan, S B Ogale, B Liu, D Viehland, V Vaithyanathan, D G Schlom, U V Waghmare, N A Spaldin, K M Rabe, M Wuttig et R Ramesh. *Epitaxial BiFeO₃ Multiferroic Thin Film Heterostructures*. Science, vol. 299, no. 5613, pages 1719–1722, 2003.
- [Wang 09] Xiaoyong Wang, Xiaofan Ren, Keith Kahen, Megan a Hahn, Manju Rajeswaran, Sara Maccagnano-Zacher, John Silcox, George E Cragg, Alexander L Efros et Todd D Krauss. *Non-blinking semiconductor nanocrystals*. Nature, vol. 459, no. 7247, pages 686–9, June 2009.
- [Wang 10] Feng Wang, Debapriya Banerjee, Yongsheng Liu, Xueyuan Chen et Xiaogang Liu. *Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy*. The Analyst, vol. 135, no. 8, pages 1839–54, August 2010.
- [Weis 85] R S Weis et T K Gaylord. *Lithium Niobate : Summary of Physical Properties and Crystal Structure*. Applied Physics A, vol. 203, pages 191–203, 1985.
- [Winter 11] Shoshana Winter, Marcin Zielinski, Dominique Chauvat, Joseph Zyss et Dan Oron. *The Second Order Nonlinear Susceptibility of Quantum Confined Semiconductors - A Single Dot Study*. Journal of Physical Chemistry C, pages 4558–4563, 2011.
- [Xia 08] Tian Xia, Michael Kovichich, Monty Liong, Lutz Maedler, Benjamin Gilbert, Haibin Shi, Joanne I Yeh, Jeffrey I Zink et Andre E Nel. *Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties*. ACS Nano, vol. 2, no. 10, pages 2121–2134, 2008.
- [Yan 98] Elsa C Y Yan, Yan Liu et Kenneth B Eienthal. *New Method for Determination of Surface Potential of Microscopic Particles by Second Harmonic Generation*. The Journal of Physical Chemistry B, vol. 102, no. 33, pages 6331–6336, 1998.
- [Yanovskii 86] V K Yanovskii et V I Voronkova. *Ferroelectric Phase Transitions and Properties of Crystals of the KTiOPO₄ Family*. physica status solidi (a), vol. 93, no. 2, pages 665–668, 1986.
- [Yi 04] Tao Yi, Nicolas Tancrez, René Clément, Isabelle Ledoux-Rak et Joseph Zyss. *Organic-MPS₃ nanocomposites with large second-order nonlinear optical response*. Journal of Luminescence, vol. 110, no. 4, pages 389–395, 2004.
- [Yokota 09a] Hiroko Yokota, Raphael Haumont, Satoshi Kawado, Jean-Micheal Kiat, Charlotte Malibert et Yoshiaki Uesu. *SHG Microscope Observations of Domain Structures in Multiferroic BiFeO₃*. Ferroelectrics, vol. 379, no. 1, pages 177–182, 2009.
- [Yokota 09b] Hiroko Yokota, Raphael Haumont, Jean-Michel Kiat, Hiroto Matsuura et Yoshiaki Uesu. *Second harmonic generation microscopic observations of a multiferroic BiFeO₃ single crystal*. Applied Physics Letters, vol. 95, no. 8, page 82904, 2009.

- [Yu 05] Shu-Jung Yu, Ming-Wei Kang, Huan-Cheng Chang, Kuan-Ming Chen et Yueh-Chung Yu. *Bright fluorescent nanodiamonds : no photobleaching and low cytotoxicity*. Journal of the American Chemical Society, vol. 127, no. 50, pages 17604–5, December 2005.
- [Yu 11] J Yu, M Baek, H E Chung et S J Choi. *Effects of physicochemical properties of zinc oxide nanoparticles on cellular uptake*. Journal of Physics : Conference Series, vol. 304, no. 1, page 12007, 2011.
- [Zhang 01] Yu Zhang, Xin Wang, Degang Fu, Jiqi Cheng, Yaochun Shen, Juzheng Liu et Zuhong Lu. *Second-order optical nonlinearity study of CdS nanoparticles via Hyper-Rayleigh scattering*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, vol. 62, pages 903–906, 2001.
- [Zhang 02] Y. Zhang, M. Ma, Y Wang, D Fu, N Gu, J Liu, Z Lu, Y Ma, L Xu et K Chen. *First order hyperpolarisability of ZnS nanocrystal quantum dots studied by Hyper-Rayleigh scattering*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, vol. 63, pages 2115–2118, 2002.
- [Zipfel 03] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams et Watt W Webb. *Nonlinear magic : multi-photon microscopy in the biosciences*. Nature biotechnology, vol. 21, no. 11, pages 1369–77, November 2003.
- [Zyss 82] J Zyss et J L Oudar. *Relations between microscopic and macroscopic lowest-order optical nonlinearities of molecular crystals with one- or two-dimensional units*. Physical Review A, vol. 26, no. 4, pages 2028–2048, October 1982.
- [Zyss 93] Joseph Zyss, Thai Chau Van, Christophe Dhenaut et Isabelle Ledoux. *Harmonic rayleigh scattering from nonlinear octupolar molecular media : the case of crystal violet*. Chemical Physics, vol. 177, no. 1, pages 281–296, 1993.

Table des figures

1.1	Représentation de la Génération de Second Harmonique	7
1.2	Phénomène optique non linéaire d'ordre 2.	8
1.3	Fluorescence excitée (a) à un photon, (b) à deux photons. <i>Extrait de [Bonacina 12]</i>	13
1.4	Microscopie classique (à gauche) et microscopie biphotonique (à droite) avec amélioration de la résolution spatiale. Le couplage à un système de balayage permet d'imager en 3 dimensions.	14
1.5	Spectres d'absorption des principaux constituants des milieux biologiques. <i>Extrait du Bio-medical Photonics Handbook [Vo-Dinh 04]</i>	14
1.6	Dimensions d'éléments biologiques en comparaison avec des marqueurs exogènes existants. <i>Extrait de [Paumier 08]</i>	16
1.7	Comparaison des phénomènes de (a) fluorescence à deux photons et de (b) génération de second harmonique. <i>Extrait de [Bonacina 12]</i>	19
1.8	Comparaison de la fluorescence (en rouge) et de la GSH (en bleu) sous excitation laser continue. En haut : image d'une culture cellulaire marquée par des particules GSH (a) en début d'excitation, (b) après 10 min d'excitation laser intense. En bas : évolution de la fluorescence et de la GSH en fonction du temps. <i>Extrait de [Staedler 12]</i>	20
1.9	Comparaison de signaux de GSH et de fluorescence sous excitation laser à 820 nm de faible intensité. (a) Signal de GSH de particules de BaTiO ₃ et (b) signal de fluorescence de QDs CdSe/ZnS. <i>Extrait de [Pantazis 10]</i>	20
1.10	Flexibilité en longueur d'onde des marqueurs. En haut : spectres d'excitation laser à différentes longueurs d'onde (A) 720 nm, (B) 790 nm, (C) 868 nm et (D) 970 nm et spectres d'émission GSH correspondants (A',B',C',D'). En bas : images de cellules HTB-182 avec agent de contraste fluorescent (en rouge) exposés à des nanocristaux GSH (en bleu), et excités aux différentes longueurs d'onde (A,B,C,D). La ligne du bas correspond aux mêmes images avec uniquement le signal de GSH. <i>Extrait de [Staedler 12]</i>	21
1.11	Détection de marqueurs GSH en profondeur. (a) Schéma d'échantillon, (b) détection de marqueurs (ou SHRIMPS, acronyme anglais pour Second Harmonic Radiation IMaging ProbeS) de 300 nm sous une épaisseur de 120 μ m d'un tissu de queue de souris. <i>Extrait de [Grange 11]</i>	21
1.12	Intérêts de l'encapsulation des nanoparticules en milieu biologique.	25
1.13	Fonctionnalisation et marquage spécifique.	25
1.14	(a) Principe de la silanisation et (b) schéma décrivant le dépôt d'APTES en fonction du temps. <i>Extrait de [Roy 10]</i>	26
1.15	Principe de bioconjugaison de BaTiO ₃ par anticorps immunoglobuline G. <i>Extrait de [Hsieh 10b]</i>	27
1.16	Cultures de cellules BEAS-2B exposées pendant 5h à des nanocristaux de (A) BaTiO ₃ , (B) KNbO ₃ , (C) LiNbO ₃ , (D) KTP, et (E) ZnO. <i>Extrait de [Staedler 12]</i>	28

1.17	Imagerie en profondeur : (a) cristaux de 100 nm sous une épaisseur de tissu de 50 μm de queue de souris, (b) cristaux de 300 nm sous une épaisseur de tissu de 120 μm . <i>Extrait de [Grange 11]</i>	29
1.18	Intensité de détection du signal GSH en fonction de la profondeur des nanocristaux, pour différentes longueurs d'onde. <i>Extrait de [Extermann 09]</i>	30
1.19	Fusion d'images GSH (vert) et de fluorescence (rouge) de cellules HeLa mise en contact avec des marqueurs GSH spécifiques : (a) avec un marquage préalable par anticorps premiers, (b) sans marquage préalable. <i>Extrait de [Hsieh 10a]</i>	31
1.20	(a) Image de marqueurs GSH sur des cellules souches différenciées. Les flèches indiquent le déplacement des marqueurs entraînés par les contractions de cellules cardiaques. Ces déplacements sont enregistrés en fonction du temps (b) hors du plan et (c) dans le plan de l'échantillon. <i>Extrait de [Magouroux 12]</i>	31
1.21	Marquage GSH de thrombocytes : (a) échantillon de sang en lumière blanche, (b) en lumière blanche et détection GSH et (c) GSH uniquement. <i>Extrait de [Urban 12]</i>	32
1.22	Localisation <i>in vivo</i> de la dystrophine dans un embryon de poisson-zèbre (a) par fluorescence et (b) par GSH. <i>Extrait de [Pantazis 10]</i>	32
1.23	Marquage GSH de cellules végétales <i>A. thaliana</i> . (a) et (b) Marqueurs GSH présents dans les germes. (c) Marqueurs dans une pousse. <i>Extrait de [Urban 12]</i>	33
1.24	Marquage GSH <i>in vivo</i> : (a) système expérimental (la souris est endormie) et (b) imagerie GSH dans une queue de souris dans les deux plans (XY) et (XZ). <i>Extrait de [Grange 11]</i>	33
2.1	Principe de la diffusion Hyper-Rayleigh (HRS).	38
2.2	Repère du laboratoire et champ incident.	39
2.3	Changement de repère entre le repère du laboratoire (X, Y, Z) et le repère de la molécule (x, y, z).	40
2.4	Configuration géométrique de détection du signal HRS.	41
2.5	Intensités HRS théoriques I_X (en rouge) et I_Z (en bleu) en fonction de la polarisation incidente γ pour une solution de pNA.	43
2.6	(a) Intensité HRS de solutions de pNA/méthanol à différentes concentrations A, B, C, D, E et F. (b) Coefficient quadratique des mêmes solutions en fonction de leur concentration. <i>Extrait de [Clays 91]</i>	44
2.7	Rapport de dépolarisation en fonction du facteur R pour le pNA.	46
2.8	Rapport de dépolarisation en fonction du facteur R pour une maille cristalline de même symétrie que le BaTiO_3 et le ZnO	51
2.9	Montage expérimental.	52
2.10	Principe de la chaîne de détection et du Boxcar.	53
2.11	Traitement du signal.	53
2.12	Traitement du signal avec hacheur.	54
2.13	Signal HRS d'une solution de pNA dans du méthanol à 0,1 mol.L ⁻¹	55
2.14	Signal HRS de suspensions de KNbO_3 (nombre de points moyennés = 1000) : (a) suspension initiale $N \sim 2.10^{10} \text{ cm}^{-3}$ et (b) même suspension diluée 50 fois $N \sim 4.10^8 \text{ cm}^{-3}$	55
2.15	Nombre de particules sondées en fonction de la concentration de la suspension.	56
2.16	Préparation des suspensions colloïdales.	57
2.17	Suspensions colloïdales de BFO de différentes concentrations obtenues à partir d'un même surnageant.	58
2.18	Mesure de concentration par pesée.	59
2.19	Seuil de solubilité du pNA	61
3.1	Image MEB de nanoparticules de BaTiO_3	64
3.2	Image MEB de nanoparticules de KNbO_3	65
3.3	Image MET de nanoparticules de KTP.	66
3.4	Image MET de nanoparticules de LiNbO_3	66
3.5	Image MEB de nanoparticules de ZnO 90-200 nm.	67
3.6	Distributions de taille en intensité (pointillé) et en nombre (trait continu) de nanoparticules de KNbO_3 en suspension.	68

3.7	Intensité HRS en fonction de la concentration (a) de la suspension de KNbO_3 et (b) de la solution de pNA.	69
3.8	(a) Signal HRS du pNA sous illumination pendant 500 s (rouge) et par intervalles de 50 s (noir, pointillés).	71
3.9	Analyse spectroscopique du signal émis par une suspension de KNbO_3 sous excitation à 1064 nm.	72
3.10	Comparaison du signal de deux séries de pNA	73
3.11	Exemple d'instabilité du signal HRS au cours d'une mesure en polarisation d'une suspension de ZnO.	73
3.12	(a) Agrégation de particules de ZnO au cours du temps. (b) Intensité HRS en fonction de la taille des agrégats.	74
3.13	Schéma du dispositif expérimental avec θ l'angle de détection du signal HRS.	75
3.14	Intensité HRS normalisée de suspensions de ZnO et de KTP en fonction de l'angle de détection. Les fluctuations observées entre 140° et 160° sont liées à des parasites optiques dus à l'interaction entre le faisceau laser et des éléments du montage et ne sont pas significatives.	75
3.15	Effet de la diffusion sur une suspension concentrée de KNbO_3	76
3.16	Distribution de taille obtenue par DLS sur deux suspensions distinctes de LiNbO_3 : (a) échantillon A et (b) échantillon B.	78
3.17	Comparaison des distributions DLS et NTA en nombre pour deux échantillons distincts A (a) et B (b) de LiNbO_3	78
3.18	(a) Distribution de taille en intensité pour trois mesures DLS successives sur une suspension de KTP et (b) distributions correspondantes en nombre par DLS et NTA.	79
3.19	(a) résultats DLS d'une deuxième suspension de KTP. (b) Distribution de taille en nombre obtenue par NTA sur la suspension de KNbO_3	80
3.20	Coefficients $\langle d \rangle$ mesurés comparés à ceux des cristaux massifs issus de la littérature. Résultats obtenus à l'issue de différentes mesures et erreurs prenant en compte la précision de la mesure DLS (par comparaison avec les données NTA) ainsi que la précision de la mesure de concentration par pesée	86
4.1	Rapport de dépolarisation du pNA pour les mêmes acquisitions.	90
4.2	Evolution du rapport de dépolarisation avec l'agrégation.	91
4.3	Rapport de dépolarisation en fonction des paramètres de taille et de polydispersité des échantillons.	91
4.4	Rapport de dépolarisation en fonction de la concentration pour des suspensions de KNbO_3 , LiNbO_3 et de KTP (en encart)	92
4.5	Intensité HRS résolue en polarisation pour (a) BaTiO_3 et (b) ZnO.	93
4.6	Détermination du facteur R à partir du rapport de dépolarisation pour le ZnO.	94
4.7	Intensité résolue en polarisation pour le KNbO_3 , le KTP et le LiNbO_3	95
4.8	Evolution du signal HRS en fonction du temps pour une microémulsion à $W=6$, $[\text{AOT}]=0,2$ M, $[\text{IO}_3^-]=0,3$ M et $[\text{Fe}^{3+}]=0,1$ M. (En encart) Diagramme DRX (Co, $K\alpha$) des nanopoudres obtenues par centrifugation des échantillons A, B, C et D. F représente le diagramme de référence (ICSD 154674) de l'iodate de fer. <i>Extrait de [El Kass 12]</i>	97
4.9	Comparaison des spectres DLS avant centrifugation et d'images MET après centrifugation des échantillons A, B, C et D. <i>Extrait de [El Kass 12]</i>	97
4.10	Mécanisme de croissance proposé pour la formation des nanobâtonnets de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ dans le système (AOT/alcane/eau). <i>Extrait de [El Kass 12, Ladj 12]</i>	98
4.11	Evolution de l'intensité HRS et du rapport de dépolarisation d'une microémulsion lors de la croissance d'aiguilles de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$	98
4.12	Evolution du rapport de dépolarisation lors de la synthèse d'aiguilles de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ et courbes de polarisation pour les prélèvements a à f de la solution mère.	99
4.13	Simulation du rapport de dépolarisation en fonction de la longueur des particules pour différents rapports β_{31}/β_{33}	102

5.1	Représentation de la structure cristalline de BiFeO ₃ dans (de gauche à droite) la maille pseudo-cubique ($a = 3,96$ et $\alpha = 89,47^\circ$), la maille rhomboédrique ($a_{rh} = 5,63$ et $\alpha_{rh} = 59,35^\circ$), et la maille hexagonale ($a_{hex} = 5,58$ et $c_{hex} = 13,87$). <i>Extrait de [Lebeugle 07a]</i>	106
5.2	Spectre d'absorbance UV-visible de nanoparticules de BFO. <i>Extrait de [Gao 07]</i>	106
5.3	Solutions aqueuses de nanocristaux de BFO à pH neutre de concentration initiale de 0,5 mg/mL, après sonification (en haut), après sédimentation (milieu) et surnageants correspondants (en bas).	108
5.4	Caractérisation HRS qualitative de différents échantillons de BFO (série 1).	109
5.5	(a) Coefficients moyens $\langle d \rangle$ en fonction de la fraction de bismuth dans le BFO (série 2) et (b) diagrammes de DRX pour les mêmes échantillons ainsi que les pics de référence pour le BiFeO ₃	110
5.6	(a) Diagramme de diffraction de rayons X sur des poudres de BFO et pics de référence pour ce matériau. (b) Taille des particules de BFO déterminées par DLS, en intensité (pointillés) et en nombre (trait plein).	111
5.7	Observation MEB des nanoparticules de BFO.	112
5.8	Echantillons de BFO de différentes concentrations obtenues après dilution. Les concentrations relatives pour chaque échantillon sont (de gauche à droite) : 1 ; 0,8 ; 0,2 ; 0,02.	112
5.9	(a) Absorbance UV-visible d'une suspension de BFO. (b) Comportement exponentiel de l'intensité HRS en fonction de la concentration.	112
5.10	(a) Coefficients moyens $\langle d \rangle$ pour une taille en nombre du BFO et comparaison avec les autres matériaux étudiés précédemment. (b) Mesure résolue en polarisation pour un échantillon de BFO/	113
A.1	Coupe longitudinale d'un faisceau gaussien. <i>Extrait de [Forget 08]</i>	137
D.1	Distribution de taille définie par une loi normale.	143
D.2	Distribution de taille définie par une loi log-normale.	145
E.1	(a) Signal HRS d'une suspension de BaTiO ₃ en fonction de la polarisation (acquisition environ 3 min) et en encart analyse spectroscopique du signal HRS sous excitation à 1064 nm. (b) Mesure DLS en nombre (trait continu) et en intensité (pointillés) de la même suspension.	147
E.2	(a) Signal HRS d'une suspension de KTP en fonction de la polarisation (acquisition environ 3 min) et en encart analyse spectroscopique du signal HRS sous excitation à 1064 nm. (b) Mesure DLS en nombre (trait continu) et en intensité (pointillés) de la même suspension.	148
E.3	(a) Signal HRS d'une suspension de LiNbO ₃ en fonction de la polarisation (acquisition environ 3 min). (b) Mesure DLS en nombre (trait continu) et en intensité (pointillés) de la même suspension.	148
E.4	(a) Signal HRS d'une suspension de ZnO en fonction de la polarisation (acquisition environ 3 min) et en encart analyse spectroscopique du signal HRS sous excitation à 1064 nm. (b) Mesure DLS en nombre (trait continu) et en intensité (pointillés) de la même suspension.	149

Liste des tableaux

1.1	Indices de réfraction de matériaux optiques non linéaires aux longueurs d'onde de 532 et 1064 nm <i>extraits de [Bass 09]</i> et longueurs de cohérence associées.	7
1.2	Tenseur de susceptibilité d'ordre 2 pour quelques classes cristallines, et équivalences dans les conditions de Kleinman. <i>Extrait de [Boyd 92]</i>	11
1.3	Propriétés et utilisation des marqueurs fluorescents. <i>Données extraites de [Lahmani 07]</i> . . .	18
3.1	Coefficients optiques non linéaires indépendants du tenseur d'hyperpolarisabilité des différents matériaux dans les conditions de Kleinman. <i>Extrait de [Nikogosyan 05, Shoji 97, Wang 01, Volk 09]</i>	64
3.2	Simulation de l'intensité HRS d'un échantillon polydisperse relativement à un échantillon monodisperse de même moyenne.	83
3.3	Erreurs approximatives liées à la distribution de taille sur $\langle d \rangle$	84
3.4	Comparaison des $\langle d \rangle$. Les tailles en intensité obtenues par DLS sont respectivement de 218 nm, 191 nm, 445 nm et 420 nm pour les suspensions de KNbO ₃ , LiNbO ₃ A, LiNbO ₃ B et KTP. Les distributions considérées sont de type log-normale.	84
3.5	Coefficients moyens : résultats	86
4.1	Rapports de dépolarisation expérimentaux des nanocristaux et de cristaux massifs.	94
4.2	Rapports de dépolarisation expérimentaux des nanocristaux et de cristaux massifs.	94
C.1	Valeurs du rapport de dépolarisation D_{pol}	142
F.1	Valeurs des coefficients moyens $\langle d \rangle$ théoriques	151

Volume de solution excité par le laser au point focal

Le laser focalisé par une lentille convergente est considéré autour du point focal comme un faisceau gaussien, représenté en figure A.1.

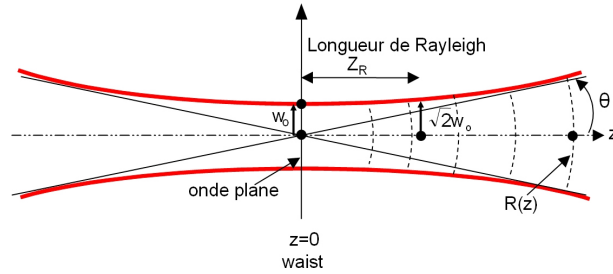


Figure A.1 – Coupe longitudinale d'un faisceau gaussien. *Extrait de [Forget 08].*

◊ **Délimitation du volume selon la direction r perpendiculaire à z .** L'intensité lumineuse d'un tel faisceau dans la direction r est telle que :

$$I = I_0 e^{-\frac{2r^2}{w^2}} \quad (\text{A.1})$$

En $z = 0$, pour une intensité au centre du faisceau I_0 , la demi-largeur du faisceau w_0 est telle que $I_{w_0} = e^{-2}I_0 = 0,14I_0$. La demi-largeur du faisceau $w(z)$ en s'éloignant selon z vaut :

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2} \quad (\text{A.2})$$

La largeur w_0 est obtenue à partir du rayon de courbure θ défini à partir de la focalisation de la lentille, du diamètre D du faisceau non focalisé et de la focale f de la lentille :

$$\tan \theta = \frac{1/2D}{f} = \frac{\lambda}{\pi w_0} \quad (\text{A.3})$$

◊ **Délimitation du volume selon la direction z .** Dans la direction z , le volume d'excitation laser est délimité par la longueur de Rayleigh z_R , profondeur à laquelle on a $w(z_r) = \sqrt{2}w_0$. La distance z_r vaut :

$$z_r = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (\text{A.4})$$

◊ **Calcul du volume total.** Le volume total correspond alors à un cylindre de hauteur $2z_r$ et de rayon $\sqrt{2}w_0$ soit :

$$V = 2z_r \pi (w_0 \sqrt{2})^2 = 4 \frac{\pi^2 w_0^4}{\lambda} \quad (\text{A.5})$$

A partir de l'équation A.3, on obtient :

$$V = 2^6 \frac{\lambda^3 f^4}{\pi^2 D^4} \quad (\text{A.6})$$

Le volume est calculé pour les valeurs suivantes :

$$\begin{cases} f = 10 \text{ cm focale de la lentille convergente} \\ \lambda = 1064 \text{ nm longueur d'onde du laser} \\ 0,6 < D < 1 \text{ cm diamètre du faisceau laser.} \end{cases}$$

On obtient un volume d'excitation $7,8 \cdot 10^{-5} < V_{exc} < 9,6 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$.

Détermination du coefficient moyen de référence du pNA

Le tenseur d'hyperpolarisabilité du pNA est de la forme :

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & \beta_{31} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \beta_{31} & 0 & \beta_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (\text{B.1})$$

Calcul des coefficients $\langle \beta_{XXX}^2 \rangle$ et $\langle \beta_{ZXX}^2 \rangle$.

$$\langle \beta_{XXX}^2 \rangle = \frac{1}{7}\beta_{33}^2 + \frac{6}{35}\beta_{33}\beta_{31} + \frac{9}{35}\beta_{31}^2 \quad (\text{B.2})$$

$$\langle \beta_{ZXX}^2 \rangle = \frac{1}{35}\beta_{33}^2 - \frac{2}{105}\beta_{33}\beta_{31} + \frac{11}{105}\beta_{31}^2 \quad (\text{B.3})$$

Le coefficient β_{31} est négligeable devant β_{33} , ce qui implique :

$$\langle \beta_{XXX}^2 \rangle = \frac{1}{7}\beta_{33}^2 \quad (\text{B.4})$$

$$\langle \beta_{ZXX}^2 \rangle = \frac{1}{35}\beta_{33}^2 \quad (\text{B.5})$$

Par définition, on en déduit le coefficient moyen.

$$\langle \beta_{pNA}^2 \rangle = \langle \beta_{XXX}^2 \rangle + \langle \beta_{ZXX}^2 \rangle = \frac{6}{35}\beta_{33}^2 \quad (\text{B.6})$$

Mesure de $\langle d \rangle$ dans différentes configurations expérimentales

◇ Présentation de la problématique

Le coefficient moyen $\langle \beta \rangle$ est généralement mesuré pour une configuration précise, correspondant à une polarisation incidente verticale (selon X) et aucun analyseur spécifique en détection, permettant la mesure de $I_X + I_Z$. Cette mesure donne directement accès au coefficient $\langle \beta_p \rangle$ de la particule. On rappelle que :

$$\langle \beta^2 \rangle = \langle \beta_{XXX}^2 \rangle + \langle \beta_{ZXX}^2 \rangle \quad (C.1)$$

Il peut être intéressant de réaliser ces mesures conjointement avec des mesures résolues en polarisation, permettant d'obtenir simultanément le coefficient moyen $\langle d \rangle$ et les coefficients indépendants d_{ij} .

Pour une mesure en polarisation sans analyseur vertical, la valeur de $\langle \beta \rangle$ est retrouvée directement à partir de l'intensité correspondant au maximum de la courbe, $I_X + I_Z$.

Pour une mesure en polarisation avec analyseur vertical, la valeur de $\langle \beta \rangle$ peut être évaluée en sommant les intensités minimale et maximale de la courbe.

Dans un dernier cas, nous avons souhaité comparer des mesures réalisées dans une autre configuration : avec une polarisation incidente verticale et un analyseur vertical. Ici, seule la valeur de I_X et donc de $\langle \beta_{XXX}^2 \rangle$ est mesurée. Il est cependant possible d'estimer le coefficient $\langle \beta \rangle$ de la particule à partir de cette mesure et d'une valeur du rapport de dépolarisation D_{pol} car :

$$D_{pol} = \frac{I_z}{I_x} = \frac{\langle \beta_{ZXX}^2 \rangle}{\langle \beta_{XXX}^2 \rangle} \quad (C.2)$$

Cela permet de faire une estimation de la valeur de I_Z connaissant celle de I_X et d'en déduire :

$$\langle \beta^2 \rangle = \langle \beta_{XXX}^2 \rangle + D_{pol} \cdot \langle \beta_{XXX}^2 \rangle = \langle \beta_{XXX}^2 \rangle (D_{pol} + 1) \quad (C.3)$$

Dans le cadre de mesures de coefficients moyens, le coefficient D_{pol} peut être calculé à partir des coefficients d_{ij} issus de la littérature, ou expérimentalement.

D'après les tenseurs d'hyperpolarisabilité présentés au chapitre 1 (table 1.2), on peut déterminer l'expression des coefficients $\langle d_{XXX}^2 \rangle$ et $\langle d_{ZXX}^2 \rangle$ en fonction des d_{ij} indépendants.

◇ ZnO et BaTiO₃

Le tenseur d'hyperpolarisabilité est de la même forme pour ces deux matériaux de structures 4mm et 6mm.

$$\langle d_{XXX}^2 \rangle = \frac{1}{7}d_{33}^2 + \frac{12}{35}d_{31}d_{33} + \frac{24}{35}d_{31}^2 \quad (C.4)$$

$$\langle d_{ZXX}^2 \rangle = \frac{1}{35}d_{33}^2 - \frac{4}{105}d_{31}d_{33} + \frac{4}{21}d_{31}^2 \quad (C.5)$$

◇ KTP et KNbO₃

Pour ces deux matériaux, on fait l'hypothèse des conditions de Kleinman.

$$\langle d_{XXX}^2 \rangle = \frac{6}{35}(d_{32}d_{33} + d_{31}d_{33} + d_{31}d_{32}) + \frac{9}{35}d_{32}^2 + \frac{9}{35}d_{31}^2 + \frac{1}{7}d_{33}^2 \quad (C.6)$$

$$\langle d_{ZXX}^2 \rangle = \frac{-2}{105}(d_{32}d_{33} + d_{31}d_{33} + d_{31}d_{32}) + \frac{11}{105}d_{32}^2 + \frac{11}{105}d_{31}^2 + \frac{1}{35}d_{33}^2 \quad (C.7)$$

◇ LiNbO₃

L'hypothèse des conditions de Kleinman est également faite pour le LiNbO₃.

$$\langle d_{XXX}^2 \rangle = \frac{1}{7}d_{33}^2 + \frac{24}{35}d_{31}^2 + \frac{12}{35}d_{31}d_{33} + \frac{8}{35}d_{22}^2 \quad (C.8)$$

$$\langle d_{XXX}^2 \rangle = \frac{1}{35}d_{33}^2 + \frac{4}{21}d_{31}^2 - \frac{4}{105}d_{31}d_{33} + \frac{16}{105}d_{22}^2 \quad (C.9)$$

◇ Valeurs numériques de D_{pol}

Les valeurs des coefficients d_{ij} utilisées sont celles référencées dans le tableau 3.1.

Tableau C.1 – Valeurs du rapport de dépolarisation D_{pol}

BaTiO ₃	KNbO ₃	KTP	LiNbO ₃	ZnO
0,214	0,126	0,121	0,129	0,292

◇ Conclusion

Cette méthode a permis la comparaison de mesures de $\langle \beta \rangle$ et $\langle d \rangle$ ayant été réalisées dans différentes configurations, et en particulier lorsque la configuration choisie ne fournit que des informations partielles. Ultérieurement, ces différentes méthodes ont été comparées expérimentalement avec un même échantillon et présentent une bonne adéquation.

Approximation statistique des distributions en taille

◇ Approximation à une loi normale

Une distribution de nanoparticules en taille est approximée à une loi normale, de paramètres μ et σ représentant respectivement la moyenne et l'écart-type.

La densité de probabilité de cette loi est donnée par l'équation :

$$\rho(D) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{D-\mu}{\sigma}\right)^2} \quad (D.1)$$

avec D la variable correspondant au diamètre des particules.

La figure montre un exemple de distribution en nombre définie par la loi normale de paramètres μ et σ .

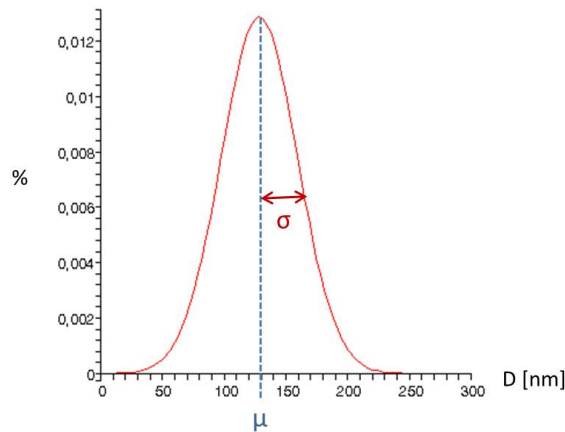


Figure D.1 – Distribution de taille définie par une loi normale.

Pour un échantillon monodisperse, pour lequel toutes les particules font une taille $D=\mu$, la distribution correspond à un écart-type nul soit $\sigma=0$. La moyenne des contributions en D^6 est donc équivalente à μ^6 . L'intensité émise par cet échantillon est donc proportionnelle à μ^6 .

Pour un échantillon polydisperse, on évalue la contribution en D^6 de chaque population et l'on en calcule la moyenne. Cela revient à écrire :

$$D^6 = \frac{\int D^6 \rho(D) dD}{\int \rho(D) dD} \quad (D.2)$$

Comme on travaille sur des distributions normalisées, alors l'intégrale $\int \rho(D)dD$ est égale à 1. L'intensité émise par cet échantillon est donc proportionnelle à l'intégrale :

$$I_{poly} \propto \int D^6 \rho(D) dD \quad (D.3)$$

Il est alors facile de déterminer le rapport de l'intensité émise par un échantillon monodisperse et celle émise par un échantillon polydisperse, de même taille moyenne μ mais de dispersion caractérisée par σ .

$$\frac{I_{poly}}{I_{mono}} = \frac{1}{\mu^6} \int D^6 \rho(D) dD \quad (D.4)$$

Ce rapport peut ensuite être résolu numériquement pour des distributions de moyenne μ et d'écart-type σ connus, en intégrant sur l'intervalle $[\mu - 3\sigma, \mu + 3\sigma]$, ce qui correspond à 99,7% de la population.

♦ **Estimation de l'erreur sur $\langle d \rangle$** On cherche maintenant à estimer l'erreur sur le coefficient optique non linéaire $\langle d \rangle$ qui est habituellement déterminé en supposant les suspensions monodisperses et en prenant pour paramètre de taille la taille moyenne en nombre de la distribution donnée par la DLS. Dans ce but, on va calculer le rapport des deux coefficients, celui habituellement déterminé $\langle d_{Nb} \rangle$ et celui prenant en compte la distribution en taille, noté $\langle d_{poly} \rangle$.

Ce rapport est calculé en s'appuyant sur le comportement de ce coefficient $\langle d^2 \rangle$ en fonction de la taille D . Il est obtenu à partir de l'intensité HRS mesurée I_{HRS} et de la taille des particules selon leur volume au carré par :

$$\langle d^2 \rangle \propto \frac{I_{HRS}}{V^2} \quad \text{avec } V^2 \propto D^6 \quad (D.5)$$

Mais on a également vu que l'analyse de l'intensité HRS nécessitait de connaître la concentration, qui évolue selon l'inverse du volume des particules. On a :

$$N \propto \frac{1}{D^3} \quad (D.6)$$

On peut définir l'influence de la distribution sur la concentration en suivant le même raisonnement que précédemment, soit :

$$\frac{N_{poly}}{N_{mono}} = \frac{\mu^3}{\int D^3 \rho(D) dD} \quad (D.7)$$

En prenant en compte ces deux contributions dues à la concentration d'une part et à l'intensité émise selon le volume au carré d'autre part, on peut écrire :

$$\langle d^2 \rangle \propto \frac{I_{HRS}}{NV^2} \quad \text{avec } \begin{cases} \frac{1}{N} \propto D^3 \\ \frac{1}{V^2} \propto \frac{1}{D^6} \end{cases} \quad (D.8)$$

Ce qui permet de déterminer le facteur reliant le $\langle d_{Nb} \rangle$ habituellement calculé et le coefficient $\langle d_{poly} \rangle$ pour une suspension de particules de taille moyenne μ et d'écart-type σ :

$$\frac{\langle d_{poly} \rangle}{\langle d_{Nb} \rangle} = \sqrt{\mu^3 \frac{\int D^3 \rho(D) dD}{\int D^6 \rho(D) dD}} \quad (D.9)$$

Le calcul numérique est effectué en prenant les précautions indiquées précédemment.

♦ Approximation à une loi log-normale

Le choix d'une loi log-normale peut s'avérer plus approprié pour certaines distributions en taille de particules. Dans ce cas, on utilise cette loi, dont la densité de probabilité est telle que :

$$\rho(D) = \frac{1}{DS\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln(D)-M}{S} \right)^2} \quad (D.10)$$

La figure montre un exemple de distribution en nombre définie par la loi log-normale, que l'on peut modéliser à partir des paramètres précédents μ et σ par :

$$M = e^\mu$$

$$S = \frac{\sigma}{\mu}$$

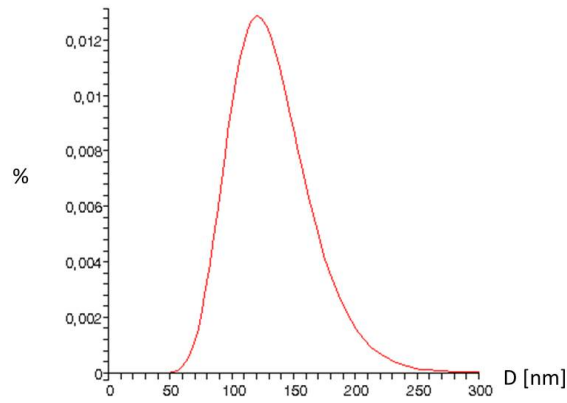


Figure D.2 – Distribution de taille définie par une loi log-normale.

Le rapport des intensités est évalué en utilisant le même raisonnement qu’avec la loi normale. Le calcul numérique doit tenir compte des bornes d’intégration de manière à englober toute la population. Celles-ci peuvent être estimées numériquement. Sur l’exemple de la figure D.2, par exemple, les bornes [0,1000] couvrent largement l’ensemble de la population. Cela peut être vérifié simplement en intégrant la densité de probabilité sur ces bornes, le résultat devant être égal à 1.

◇ BaTiO₃

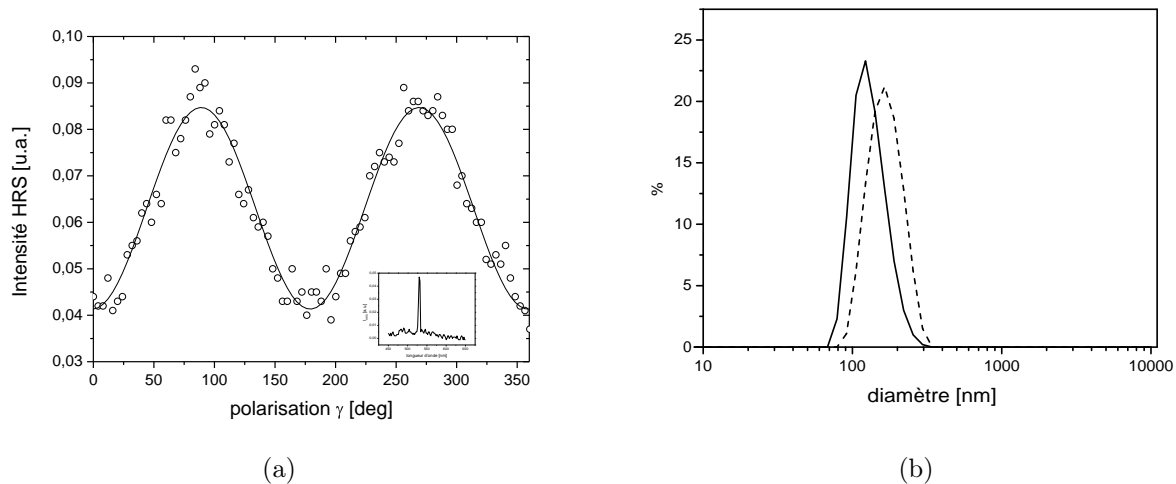


Figure E.1 – (a) Signal HRS d’une suspension de BaTiO₃ en fonction de la polarisation (acquisition environ 3 min) et en encart analyse spectroscopique du signal HRS sous excitation à 1064 nm. (b) Mesure DLS en nombre (trait continu) et en intensité (pointillés) de la même suspension.

◇ KTP

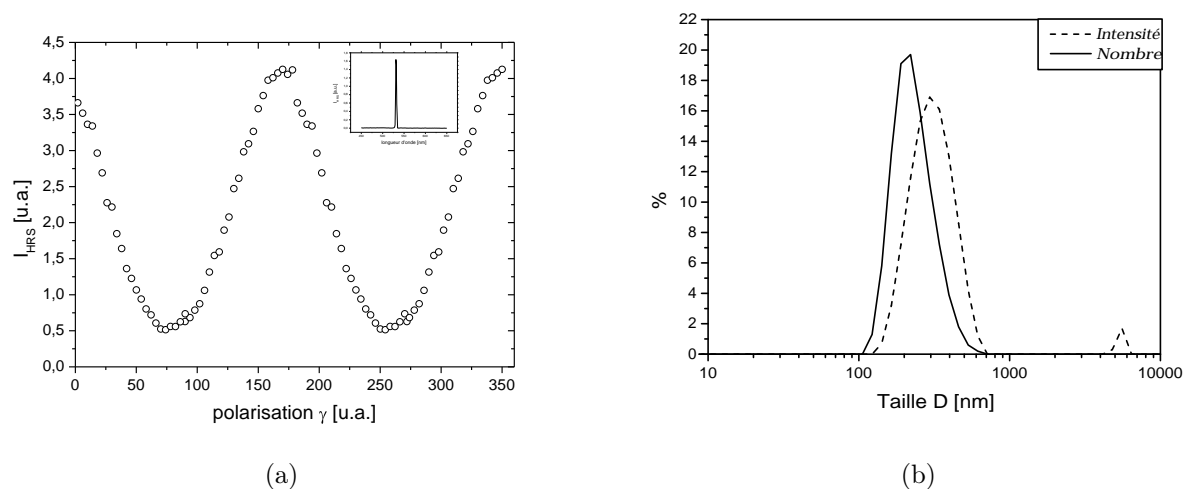


Figure E.2 – (a) Signal HRS d'une suspension de KTP en fonction de la polarisation (acquisition environ 3 min) et en encart analyse spectroscopique du signal HRS sous excitation à 1064 nm. (b) Mesure DLS en nombre (trait continu) et en intensité (pointillés) de la même suspension.

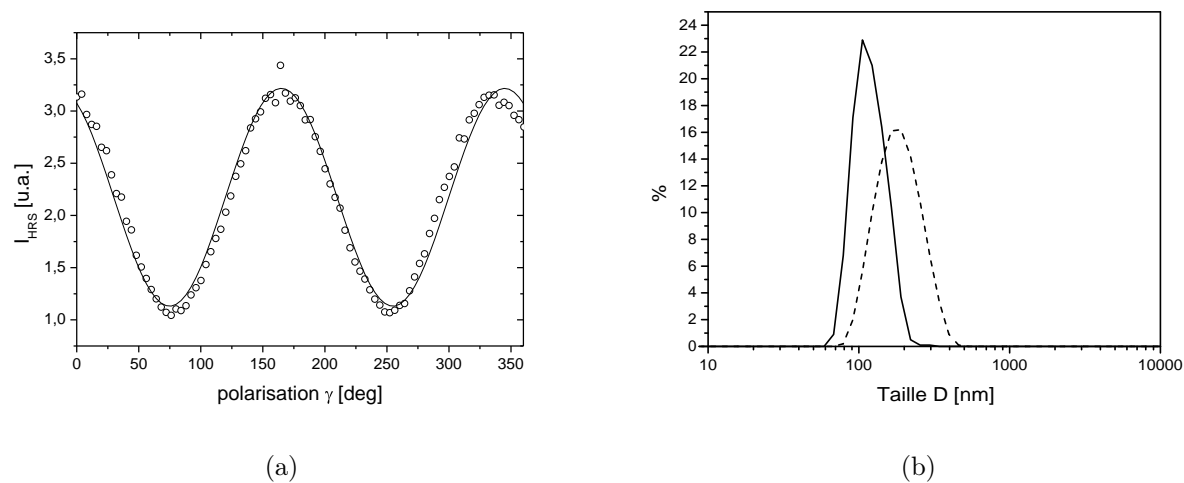
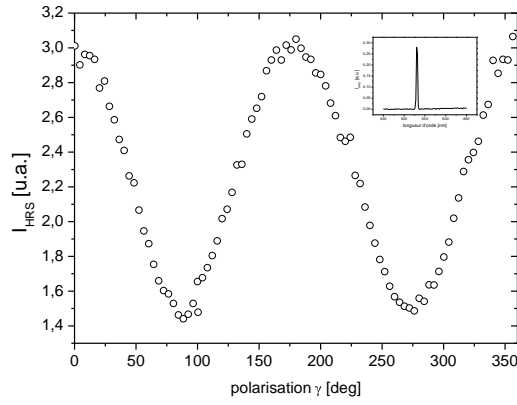
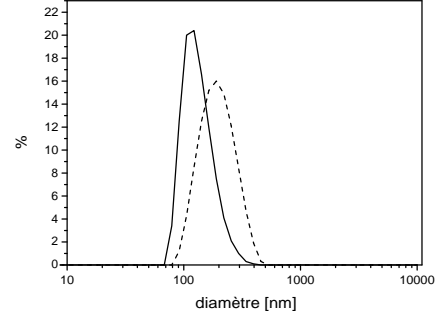
◇ LiNbO₃

Figure E.3 – (a) Signal HRS d'une suspension de LiNbO₃ en fonction de la polarisation (acquisition environ 3 min). (b) Mesure DLS en nombre (trait continu) et en intensité (pointillés) de la même suspension.

◇ ZnO



(a)



(b)

Figure E.4 – (a) Signal HRS d’une suspension de ZnO en fonction de la polarisation (acquisition environ 3 min) et en encart analyse spectroscopique du signal HRS sous excitation à 1064 nm. (b) Mesure DLS en nombre (trait continu) et en intensité (pointillés) de la même suspension.

Détermination des coefficients moyens $\langle d \rangle$ à partir des valeurs de la littérature

Les valeurs théoriques des coefficients moyens $\langle d \rangle$ sont issues des valeurs des d_{ij} des matériaux massifs et des relations entre ces coefficients et les d_{IJK} . La valeur de $\langle d^2 \rangle$ est facile à calculer à partir de l'expression des coefficients $\langle d_{XXX}^2 \rangle$ et $\langle d_{ZXX}^2 \rangle$ en fonction des d_{ij} indépendants. Les valeurs utilisées pour ces derniers, issues de la littérature, sont reportées dans le tableau 3.1 .

◇ **ZnO et BaTiO₃**

$$\langle d^2 \rangle = \frac{6}{35}d_{33}^2 + \frac{32}{105}d_{31}d_{33} + \frac{92}{105}d_{31}^2 \quad (\text{F.1})$$

◇ **KTP et KNbO₃**

Pour ces deux matériaux, on fait l'hypothèse des conditions de Kleinman.

$$\langle d^2 \rangle = \frac{16}{105}(d_{32}d_{33} + d_{31}d_{33} + d_{31}d_{32}) + \frac{38}{105}d_{32}^2 + \frac{38}{105}d_{31}^2 + \frac{6}{35}d_{33}^2 \quad (\text{F.2})$$

◇ **LiNbO₃**

L'hypothèse des conditions de Kleinman est également faite pour le LiNbO₃.

$$\langle d^2 \rangle = \frac{6}{35}d_{33}^2 + \frac{92}{105}d_{31}^2 + \frac{32}{105}d_{31}d_{33} + \frac{8}{21}d_{22}^2 \quad (\text{F.3})$$

◇ **Valeurs numériques de $\langle d \rangle$, issues des d_{ij} de la littérature [Nikogosyan 05, Shoji 97, Wang 01]. Voir tableau 3.1.**

Tableau F.1 – Valeurs des coefficients moyens $\langle d \rangle$ théoriques

BaTiO ₃	KNbO ₃	KTP	LiNbO ₃	ZnO
14,1	15,3	7,6	17,3	2,8

Caractérisation par diffusion de second harmonique de nanocristaux pour l'imagerie biomédicale

Résumé

Les nanocristaux à structure non-centrosymétrique présentent des propriétés optiques non linéaires prometteuses pour une utilisation en tant que marqueurs optiques en imagerie biomédicale, avec un intérêt significatif en termes de suivi sur de longues durées et de profondeur de pénétration dans les tissus biologiques.

Le développement de ces marqueurs nécessite la détermination de leurs efficacités optiques non linéaires afin de pouvoir sélectionner les nanocristaux les plus prometteurs. Pour cela, la technique de diffusion Hyper-Rayleigh a été adaptée à la caractérisation de suspensions de nanoparticules (BaTiO_3 , KNbO_3 , KTP, LiNbO_3 et ZnO , BiFeO_3) pour lesquelles l'influence de paramètres comme la taille, la concentration ou l'état d'agrégation a été analysée et discutée. Les nanocristaux de BiFeO_3 possèdent une efficacité optique non linéaire largement supérieure aux autres particules, démontrant leur potentiel pour la réalisation de nano-sondes optiques particulièrement performantes. Des mesures résolues en polarisation ont également été mises en œuvre pour déterminer les coefficients optiques non linéaires indépendants des particules étudiées. Dans ce cadre, une étude a permis de mettre en évidence l'influence de la forme des nanocristaux sur cette réponse.

Mots-clés : Génération de Second Harmonique, imagerie biomédicale, diffusion Hyper-Rayleigh, nanocristaux, nanoparticules

Abstract

Non-centrosymmetric nanocrystals show promising nonlinear optical properties for being used as optical labels in bio-imaging applications, with significant interest for observations of long duration and for penetration depth into biological tissues.

The development of such biomarkers requires the determination of their nonlinear optical properties to select the best potential markers. In this thesis, Hyper-Rayleigh Scattering (HRS) technique is used to determine nonlinear efficiencies of several nanocrystals (BaTiO_3 , KNbO_3 , KTP, LiNbO_3 , ZnO and BiFeO_3). These ensemble measurements have been performed on nanocrystals suspensions, for which the influence of parameters such as size, concentration and aggregation state was discussed. BiFeO_3 nanocrystals offer the best nonlinear optical efficiency compared to other particles, showing their potential as efficient optical biomarkers. Polarisation-resolved measurements have also been performed to retrieve individual coefficients of the nonlinear tensor of the investigated materials and influent parameters such as nanocrystals shape have been identified.

Keywords : Second Harmonic Generation, Biomedical imaging, Hyper-Rayleigh Scattering, nanoparticles, nanocrystals

